NEW POLYPEPTIDE

Patent Number: JP2227075

Publication date: 1990-09-10

Inventor(s): SASAKI KATSUTOSHI; others: 04

Applicant(s):: KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

Requested Patent: JP2227075

Application Number: JP19890253097 19890928

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N9/72; C07K13/00; C07K15/14; C12N1/21; C12N5/10;

C12N9/64; C12N15/27; C12N15/58; C12N15/70; C12N15/85; C12P21/02

EC Classification:

Equivalents: JP2928287B2

Abstract

PURPOSE: To efficiently produce polypeptide by culturing host cell transformed with plasmid including DNA coding polypeptide having amino acid sequence capable of adding at least one saccharides.

CONSTITUTION: Plasmid having amino acid sequence capable of adding at least one new saccharides and containing DNA coding polypeptide capable of adding saccharides by amino acid-substitution, amino acid-omitting or amino acid- inserting to polypeptide is prepared. Host cell is transformed using said plasmid and the transformant is cultured in medium to accumulate polypeptide or glycosylated polypeptide in the cultured matter. Next, polypeptide or glycosylated polypeptide is collected from the cultured matter.

Data supplied from the esp@cenet database · 12

121,017 attach Puher #32 121,017

31 p x m 2 attach

99日本国特許庁(JP)

印符 許出願公

母公開特許公報(A) 平2-227075

Dint Cl. 3

識別記号

庁内整理番号

@公開 平成2年(1990)9月10日

9/72 13/00

7823-4B 8318-4H 8318-4H **

審査請求 未請求 請求項の数 28 (全94頁)

❷発明の名称

新規ポリペプチド

团特 顧 平1-253097

單 平1(1989)9月28日 29出

優先権主張

❷昭63(1988)9月29日❷日本(JP)@特顯 昭63-245705

明者 @発 ⑦発

佐々木 西 安

克 敏 也 赱 盘

東京都町田市旭町3-6-6 東京都町田市中町3-9-11

東京都町田市旭町3-6-6

79発 伊発

伊発

መ出

Ħ

幸 蓷

東京都町田市成湖2730-15 神奈川県相模原市相原 6-9-48

協和國酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

題 最終頁に続く

1. 発明の名称

新規ポリペプチド

2. 特許財水の範囲

- (1) 少なくとも1つの新たな雑雑の付加が可能な アミノ酸配列を育する新規ポリペプテド。
- ② ポリペプチャに対し、アミノ酸量後、アミノ 酸欠失あるいはアミノ酸婦人を行うことにより、 糖嬢の付加が可能となったものであることを特 徴とする請求項1の新規ポリペプチャ。
- 四 女アミノ世紀列がNーグリコシレーション結 合都位(アスパラギン鉄基~X鉄基-スレナニ ン芸基あるいはセリン芸基、X表基はプロリン 以外のアミノ酸)であることを特徴とする時水 項1の新規ポリペプチド。
- (4) 請求項1から3のいずれかに記載したポリペ プチャに少なくとも1つの普集が付加したグラ コシル化ポリペプチャ。
- □ 付加した雑額が、Nーグリコジド総合型結構、

- 〇一ダリコシド結合豊語線、あるいは化学合成 した軽額であることを特徴とする請求項(記載 のグリコシル化ポリペプチャ。
- 毎舗の付加部位がポリペプチドにおけるプロ ナアーゼの切断部位の近傍(その切断部位から 8 アミノ酸疾基以内) にあることを特徴とする 請求項しから.5 のいずれかに記載のポリペプチ Pまたはグリコシル化ポリペプテド。
- の 簡独の付加品位が、ポリペプチャの表面部位 にあることを特徴とする請求項1から5に記載 のポリペプテドまたはグリコシル化ポリペプチ
- 図 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプ チドまたはダリコシル化ポリペプチドがコロニ ー刺激因子(顆粒球・マタロファージョロニー 刺激因子、顆粒珠コロニー刺激因子、マタロフ ァーダコロニー刺激因子)、組織プラスミノー ゲン活住化因子(以下、t-PAと 起する)、 ウロキナーゼ (以下、UKと略記する) 、イン **ターフェロジーα、インターフェロンーβ、イ**

ンターフェロンーで、リンホトキシン、リポコルチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエテンまたはインターロイキンー1、 -2、-3、-4、-5、-8または-7であることを特徴とする論求項1から7に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

- 切 除来項1から7のいずれかに記載のボリペプチドまたはダリコシル化ポリペプチドが、ヒト 類粒はコロニー創造因子(以下、トGーCSF と な記する)であり、トGーCSFのスレオニン残器(N末畑から1番目)がアラニン残器で、グリシン残器(N末畑から3番目)がテロシン残器で、プロリン残器で、システィン残器で、プロリン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、システィン残器で、カーの対象のよりである。
- 69 請求項3記載のポリペプテドまたはグリコシ

末端から164番目)までの間】に存在することを特徴とする跡求項1から7のいずれかに記 就のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプ チド。

- 69 成熟型UKのフェニールアラニン機基 (N末 増から164番目)をアスパラギン機基に置換 した請求項13記載のポリペプチドまたはグリ コシル化ポリペプチド。
- 69 成熟型UKのロイシン残器(N末端から153番目)をアスパラギン残器に置換し、かつプロリン残器(N末端から155番目)をスレオニン残器に置換した請求項13足数のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。
- 69 第8表および第7表に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を育する請求項13記 歳のボリペプチドまたはダリコシル化ポリペプ チャ。
- の 請求項1から16のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのポリペプチドのポリペプチドのポリップチャのポリップをファインリポ技能

ル化ポリペプチドのアラニン技器(N文権から 5 目)がアスパラギン技器で歴後されている ことを特徴とする請求項9に記載のポリペプチ ドまたはグリコシル化ポリペプチド。

- CD 請求項 9 記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのグルタミン残器 (N末端から 1 4 5 号目) がアスパラギン残器で、アルギニン残器 (N末端から 1 4 7 号目) がセリン残器でそれぞれ置換されていることを特徴とする請求項 9 に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。
- 63 第2表、第3表、および第4表に示したアミノ酸配列から退ばれるアミノ酸配列を有する請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。
- (3) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプ チドまたはグリコシル化ポリペプチドがUKで あり、錯鍼の付加部位が成熟型UKのトロンピ ン切断部位の近傍 [グリシン残基 (N末端から 149番目) からフェニールアラニン残基 (N

(DNA) .

- 回 請求項 1.7 に記載の DNA を組み込んでなる 組換え体プラスミド。
- (3) プラスミドDNAとして、大勝個トリプトファンプロモーターあるいはSV40初期プロモーターを有するプラスミドDNAを用い、はDNAがはプラスミドDNAのプロモーターの下流に値が込まれたことを特徴とする時求項18記載の組役え体プラスミド。
- 図 PAS 2 8、PASN 6、PASN 1 4 5、PSE 1 UKS 1 1 dおよび PSE UKS 3 から遠ばれる論求項 1 8 または 1 9 に記載の板換え体プラス 1 ド
- (21) 対求項18から26のいずれかに記載の組 接え体プラスミドを含有する数生物または動物 細点。
- (22) 旅散生物が大脳歯に属することを特徴とする請求項 2 1 記載の散生物。
- (23) 族動物緻密がCHO (Chinese Hamster - Ovary)組陷またはナマルバ細胞であることを特

徴とする時末項21記載の動物収扱。

- (24) 請求項21記載の数生物または動物部的を 塔地に培養し、 要物中にポリペプチドまたは ダリコシル化ポリペプチドを響覆させ、放培要 物から該ポリペプチドまたは波グリコシル化ポ リペプチドを採取することを特徴とするポリペ プチドまたはグリコシル化ポリペプチドの製造 生。
- (25) 請求項21記載の数生物または動物細胞を、 1 ーデオキシノジリマイシン、1 ーデオキシマ ンノジリマイシンまたはスワインソニンの範囲 の生合成あるいはプロセッシングに関する酵素 の阻害剤を含有する培地で培養することにより、 付加する雑額構造を変化させることを特徴とす る論文項2.4記載の製み柱。
- (26) 抜散生物が大狐歯、酵母またはカビに属することを特徴とする疎水項24または25記載の解除体
- (27) 核動物細胞がCHO (Chicese Hamster Ovary)細胞またはナマルパ細胞であることを特

法に関する。

本発明はすべてのポリペプチャに当てはめることが可能である。本発明によって提供される新たな経想が付加したポリペプチャは、軽額の多様な機能が付加されたものであり、天然の蛋白質に比較して物性や活性が優れている。したがって本発明によって提供される整額付加ポリペプチャは、幅広い分野において有用であると期待される。

例えば、本発明のボリベプチドまたはグリコシル化ポリベプチドがヒト環粒球コロニー創造因子(hGーCSF)である場合、適当な部位に新たな結婚が付加したhGーCSFは、プロテアーゼに対する抵抗性が増加する。この新規hGーCSFは、血中におけるタリアランス(除去)が遅くなっていることも十分期待され、医薬品としての利用が期待される。

また、本発明のグリコシル化ポリペプチドがウロキナーゼ(UK)である場合も関係に、新たな 無値が適当な配位に付加したUKは、付加しない ものより優れた血栓体解作用を有しており脳血栓、 歌とする時来項24または25記載の製造法。

(28) 請求項2 4から2 7 のいずれかに記載の製造法で提取したグリコシル化ポリペプチドを、シアリダーゼ、βーガラクトシダーゼ、βートートーアセチルグルコサミニダーゼ、βーマンノシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選ばれるグリコシダーゼまたはシアル酸トランスフェラーゼで処理することにより、付加する種類の構造を変化させることを特徴とするグリコシル化ポリペプチドの製造法。

3.発明の辞細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新たな器類の付加が可能なアミノ設配列を有する新規ポリペプチドおよびそのグリコシル化ポリペプチド、該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドをコードするデオキシリポ核酸(DNA)、該DNAを含有する植技人はプラスミド、該植性え体プラスミドで形質伝換した宿主細胞および形質伝換細胞を用いる該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドの製造

心筋梗塞などの治療薬としての利用が期待される。 従 来 の 技 術

大協館などの原核生物によって生産される蛋白質が精緻を有していないのに対し、酵母、カビ、植物細胞または動物細胞等の実核生物によって生産される蛋白質には感知が結合している場合が多

付加する糖油は、主として2つの群に大別できる。一つは、蛋白質中のアスパラギン(Asn) 質基に結合するドーグリコシド結合型糖油で、もう一つは、蛋白質中のセリン(Ser)またはスレオニン(Thr)質基に結合するローグリコシド約合型糖油である。

Nーグリコンド結合型額線はNーアセチルグルコサミン2個とマンノース3個の五額よりなるコア構造を共通の基本構造としており、その結婚構造から高マンノース型、複合型、そしてハイブリッド型の3つに分類されている(第1回)。これらのアスパラギン結合型額額は、18~20のイソブレンユニットからなるポリイソブレノイドア

特開平2-227075 (4)

ルコールであるとりコールにピロリン酸をはさんでNーアセチルグルコサミン2個、マンノース9個、そしてグルコース3個が結合したりピド中間体(6icsNans6icNAcs-PP-Doi)(第2回)を前駆体としている。

リピド中間体が形成される反応経路は"ドリコールリン酸サイタル"としてよく知られている (第3間)。

そして租面小的体(rER)内腔において生成中のポリペプチド娘中のAsnーXーSer/Thrといったアミノ酸配列(Nーグリコシル化部位)中のAsn製基に、このリピド中間体の結婚部分がひとまとめに伝序され、Nーグリコシド結合を形成する。この場合Xはプロリン(Pro)以外のどんなアミノ酸でもよく、またこの反応は、原辞業の1種である"オリゴ結伝存酵素(Gligosaccharyl transferase)"によって触媒されることが知られている。この後、rERおよびゴルジ体を遭遇する過程で結婚はトリミングとプロセシングを受け、高マンノース型、ハイブリッド型あ

るいは複合型として完成される(第4回)。トリ ミングとプロセッシングの過程においては多くの グリコンダーゼとグリコシルトランスフェラーゼ が関与していることが知られている。

高マンノース型は、動植物起源および酵母、カビの結蛋白質においてしばしば見られるのに対し、 複合型精雑は動物起源に限定されていると推定されている。

Nーグリコシド結合型製剤は上述したようにポリペプチド中のAsn-X-Ser/Thr (XはPro以外のアミノ酸)中のAsn残基に結合するが多くの蛋白質中には非糖類結合のAsn-X-Ser/Thr配列が存在しており、この配列が存在しており、この配列が存在すれば必ず種類が付加するというものではない。事実ウイリアム・ジェイ・レナルツ(William J. Lennarz)らは、蛋白質の立体構造が種類の結合を促す上で重要であることを示唆している。それは、Asn-X-Ser/Thrの配列を持った単純なトリペプチドや、天然の蛋白質のように複雑に折りたたまれた空間構造そもたな

い変性蛋白質がインピトロ(in vitro)で酵素的に、 比較的容易に確保を結合させるという知見に基づ いている。

一方、Oーグリコシド結合型链線においては、 ポリペプチド中のSerまたはThr残茎にN-アセチルガラタトサミンを介して結合し、それに ガラタトース、シアル酸、フコース、文雄NIT セチルガラタトサミンが結合しているのが普通で ある〔鈴木 旺ら:蛋白黄、抜酸、酵素、30。 513 (1985)]。また上述のN-グリコシド結合型 複数の場合と異なり、その合成にTERは菌与せ ず、すべてゴルグ体で行われると考えられている [ジョンソン (Johnson)ら: セル(Cell)、32. 987 (1983)]。また、Nーグリコシド結合型の場合と は異なり物盤付加におけるアミノ鞭化列上の投資 性も存在していない。しかしながらPro-Thr/Ser 、 Tor/Ser-Pro 、Tor/Ser-X,-,-Proなどのように Proが近くに存在した 合に結婚が付加しやす い傾向にあることが知られている。この 合、X はどんなアミノ酸でもよい(高値ら:プロシーデ

ィング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オ ブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA、<u>81</u>, 2021(1984)] _

特蛋白質の製鋼の本質的な生物学的機能については、未知の部分も多いが、多くの糖蛋白質に関する研究により、現在までに糖額の多様な機能が明らかにされてきている。

まず、糖油は蛋白質を安定化することが知られている。血中におけるクリアランスの選延もそのし何である。大腸歯に遺伝子移入してつくられたヒトエリスロポイエテン(アスパラギン結合型類類を欠く)、あるいは、糖類を酵素処理で除去したヒトエリスロポイエチン(凝集する)は、invitro では活性を示すが、インピポ(ia vivo) では急速にクリアランスされ、活性が低いことが知られている(アーダル(Dordal)ら: エンアクリノロジー(Endocrinology)、116、2293(1985)およびブローネ(Browne)ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジア・オン・クオンティテェイティブ・バイオロジー(Cold Spr. Harb, Symp, Quant,

Biol.)。51,693(1986)]。またヒト観粒球・マ タロファージコロニー刺激因子 (AGM-CSP) は、天然ではNーダリコシド前会を独加を2本格 っているが、雑畑の本数を辿らすとそれに比例し てラット血費からのタリアランス速度が速まるこ とが知られている(アナヒュー (Domahue)ら: コ ールド・スプリング・ハーパー・シンポジア・オ ン・タオンティテェイティブ・パイオロジー(Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.). 51 , 685 (1986) } . クリアランスの速度およびタリアランスされる部 位は毎額の構造によっても変化し、シアル酸がつ いたhGM-CSFは腎臓でクリアランスされる のに対し、シアル酸を除去したhGM-CSFは クリアランス進度が退まり、肝臓でクリアランス されことが知られている。また、ラット肝初代培 美の系で各種のアスパラギン結合型糖類生合成阻 害剤存在下に生合成された、糖放構造の異なる α i-acid glycogratein について、ラットの血漿 からのタリアランス速度およびラット灌漑液から のクリアランス速度を貫べたところ、どちらの場

合も、高マンノース型>被領欠景型>ハイブリッド型>複合型 (天然型)の項であった (グロス (Gross) ら: ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Bur. J. Biockes.) . 162 . 83 (1987)]。安定化の別の例として、確値がプロサアーゼ抵抗性を付与していることが知られている。例えば、フィブロネクチン (fibronectin) の被領形成をツニカマイシンで阻害すると、得られた経額欠長フィブロネクチンの報題内接白質の分解の速度が増進する (オルデン (Ulden) ら: セル (Ceil), 13 , 461 (1987)]。 結構の付加により、 熱安定性や抗凍結性が増大することも知られている。また、エリスロポイエチンやβーインターフェロンなどにおいては、蛋白質の体解性の増大に額値が寄与していることが知られている。

糖類は、蛋白質が正しい立体構造を保持するのにも役立っている。水泡性口内炎ウイルスの原結合競技白質の天然に存在する2本のNーグリコシ ド結合型器類を除去すると、蛋白質の細胞表面への輸送が阻害されるが、その蛋白質に新たな結功

が付加されるとそれが回復することが知られている。この場合、領額の設法により、ジスルフィヤ 結合による蛋白質分子間の会合が視起され、その結果蛋白質検送が阻害されることが明らかとなった。また新しく付加した領域は、この会合を阻害することができずび蛋白質検送が可能になったと考することができずび蛋白質検送が可能になったと考えられている。またその反面、導入する位置については、かなりの設強性があることがあることを明らかとなった(ローズ (Rose) ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol, Chem.)。263、5948 および5955(1988))。

糖類がポリペプテド上の抗原部位をマスクしている何も知られている。 b GM-CSF、プロラクチン、インターフュロンーで、ラウシャー

(Rauscher) 白血病ウイルスgp70およびインフル エンデへマグルチニンにおいて、ポリクローナル 抗体またはペプチド上の特定の領域に対する単クローン抗体を用いた実験から、これら蛋白質の結婚が、抗体との反応を阻害しているという結論が引き出された。しかし、この反面、ある種の蛋白質においては逆に免疫反応を誘発する場合も知られており、結婚が二重の役割を減ずることが示唆されている。

額額自身が額蓋白質の括性発現に直接係わっている場合もあることが知られている。例えば、異体形成ホルモン、線格制液ホルモン、絨毛性性保 制造ホルモンのような器蛋白質ホルモンがそれである。

最後に、着額の重要な機能として、延繳項象への関与ということが上げられる。 着額が、細胞間、蛋白質問の超級現象に関与していると考えられる多くの例が知られており、 独類の構造の違いにより生体内タリアランスの場所が異なることもその1例である。

以上籍変白質の籍類の構造と機能について述べ できた。糖類の構造と機能の解析の手段について は現在者しく遠展してきており、ペプチド骨格に 結合した複類の物理化学的性質についていろいろ な解析が可能となってきた。

とくに簡単を選次解離してゆく特異性の高い即 書(エキソグリコンダーゼ)やペプチド級との部 合点をペプチド級と観線の双方を傷めずに開設す るがリコペプチダーゼやエンド型グリコンターゼ が実用になったことによって、結婚の生物学のた ながりコペプチダーゼやエンド型がリコンターゼ が実用になったことによって、結婚の生物学のた なけれても即梱な研究ができるようになった ルトランスフェラーゼにより、新たな結婚を入り、 することも可能である。例えば、シアル酸トラン スフェラーゼにより、結婚の末端にシアルル ないトランスフェラーゼやがリコシダーゼの阻害 がルトランスフェラーゼやがリコシダーゼの阻害 がルトランスフェラーゼやがリコシダーゼの阻害 対を用いることにより、付加する権額を変化させ る技術もよく知られている。

先に述べた水池性口内炎ウイルスの痕結合種蛋白質のように、糖類を付加する技法が糖額の機能 を研究する目的に用いられた例はあるが、産業上

プチドのかかる諸性質を改善することは重要な意 題である。

問題点を解決するための手段

発明の具体的説明

本発明によれば、少なくとも1つの結算の付加 が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチャ およびそのグリコシル化ポリペプチャ、抜ポリペ 利用価値の高いポリペプチドの改良に用いられた 例はまだない。一般に、生理器性ポリペプチドは、 プロテアーゼ切断による活性低下、熱処理による 活性低下、あるいは生体内に投与したときにクリ アランスを受けやすいことなどの行ましくない生 質を有する場合が多い。これまでに、このような ポリペプチドのアミノ酸配列を改変し、新たなセ 却を意図的に付加することにより、プロテアーゼ 抵抗性、熱安定性、あるいは血中安定性などを増 加させたという例は知られていない。本発明にお いて意図的に折たな糖組を付加することにより、 上記ポリペプチドの排性質を改善する手法を開発 した。

発明が解決しようとする問題点

生理話性ポリペプチドは、一般に、プロテアーゼ切断による活性低下、無処理による活性低下、 生体内に投与したときにタリアランスを受けやすいなど、不利な性質を有している場合が多い。た とえば、UKはトロンピンというプロテアーゼに よって不活性質になってしまう。生理活性ポリペ

プチドまたは抜グリコシル化ポリペプチドをコー ドするDNA、抜DNAを含有する組換え体プラスミド、鉄組換え体プラスミドを含む微生物また は動物細胞、および鉄微生物または動物細胞を用いる鉄ポリペプチドまたは鉄グリコシル化ポリペ プチドの製造法が提供される。

本発明の目的は、任意のポリペプチとまたはグリコシル化ポリペプチドに少なくとも一つの新たな類様を付加することにより、前記した歯類のリコシル化ポリペプチドに折たはグリコをした歯類を付加すると、ポリペプチとはがリコシル化ポリペプチドに新たな舞踊を行かれている。例えば本発明は新たな舞踊を行かれている。例えば本発明は大きなリーンとなり、大きなものである。またプラとなるととでより、アラとなると、またが、大きく関与している場合においては、智知を付加さることによりプロテアーと抵抗性を増加さることによりプロテアーと抵抗性を増加さることによりプロテアーと表ものである。

生物学的活性を制御することができる。

新たな糖油の付加が可能なアミノ酸配列をポリペプチド中に作成するためには、ポリペプチドのアミノ酸性後、アミノ酸欠失、アミノ酸挿入などの方法によって行うことができる。

たとえばNーグリコシド結合型転摘を結合させるためのアミノ酸としては、アスパラギン(Aェπ)が、〇ーグリコシド結合型蓄積を結合させるためのアミノ酸としては、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)が知られているので、これらのアミノ酸がギリベブチド上の好適な位置に存在するようにすればよい。

好酒には、Asn-X-Thr/Ser (Xはプロリン以外のアミノ酸)で示されるトリペプチドモ、対象とするポリペプチドの適当な部位に導入することによって軽額の付加が可能なアミノ酸を抜ポリペプチド中に存在させることができる。このトリペプチドの導入は遺伝子の部位特異的変異の方法に従って行うことができる。

新たな結婚を付加するにあたって意要なのは、

パイオケミストリー(Biochemistry) 13 ,222 (1974)、アドパアンスト・エンディモロジー(Adv. Enzymol.) 47 . 45(1978)] の方法、あるいはロー ブソン(Robson) (ジャーナル・オブ・モレキュラ ー・バイオロジー(J. Nol. Biol.) 107 . 327(1976), 同 120 .97(1978)] の方法で 2 次構造を予想する。 ことで、ターン構造を形成しそうな場所を推定す ることもできる。また、各種プロテアーゼで処理 して、切断されやすい部位を同定することにより、 表面部位に関してさらに詳しい情報を得ることが できる。プロテアーゼ切断部位近接は、ポリペプ チャの表面に位置している可能性が高いと考えら れるため、ポリペプチドに効率よく糖値を付加し ようとする際や、天然の蛋白質と同等の活性を有 する結構付加ポリペプテドを取得しようとする際 には、複雑付加の絶好の既的部位となる。また、 プロテアーゼ切断部位近傍に複雑が付加されたポ タペプチドは、そのプロテアーゼに対して抵抗性 になることが期待され、その安定化を図るという 意味においても、プロテアーゼ切断部位近 は結

袋線を付加する位置である。前途のように、ポリ ペプチド上の位置によっては結集が付加しない場 合があるし、また新たな糖塩が付加されても、そ の結果ポリペプチドの正しい立体構造が破壊され、 膜輸送が阻害されたり、活性を耐失する場合もあ る。したがって、新たな糖類を付加する位置は少 なくともポリペプチドの表面部位にある必要があ る。立体構造が既にわかっているポリペプチドに おいては、その表面部位があきらかなので、容易 に付加郎位を決定することができる。また、語娘 付加による活性低下を最小限におさえるためには、 活性部位から文体構造上できるだけ離れている方 が望ましい。そこで、文体構造に加え活性部位も 明らかなポリペプチドにおいては上記のことを考 慮して付加部位を決定できる。一方、ポリペプチ ドの立体構造が未知の場合には、ポリペプチドの 一次構造よりその親水性 (Hydropathy)を計算し、 表面邸位を推定することができる。また、一次構 澄からチョーーファスマン(Chou-fassan) 〔パイ オケミストリー(Biochemistry)<u>13</u>, 211 (1974).

類の付加部位として非常に適しているといえる。 好適にはポリペプチャのプロテアーゼ切断部位か ら8アミノ酸残基以内に額傾付加部位を導入する ことが望ましい。

また、立体構造が反知の場合も未知の場合も、 上記のようにして選択した部位のいくつかに実際 に精鎖付加部位を導入し、そこに実際に結婚が付 加するかどうかを確認する必要がある。また、 類が付加されたポリベブチドについては、それが 生物学的活性を保持しているか、活性の低下はな いか、すぐれた機能が付加されているか、などに ついて評価する必要がある。

本発明の対象とするポリペプチドとしては、生理器性を有するものであればいずれでもよいが、 好選には、コロニー耐激因子(顆粒球・マクロファージコロニー耐激因子、顆粒球コロニー耐激因子、顆粒球コロニー耐激因子、スパロファージコロニー制激因子)、組織プラスミノーゲン活性化因子(tーPA)、ウロキナーゼ(UK)、インターフェロンーで、リンホーフェロンーで、リンホ トキシン、リポコルチン、スーパーオキシドジスムターゼ、エリスロポイエチン、インターロイキンー1、一2、一3、一4、一5、一6または一7などがあげられる。

ずりペプテドに結論を付加する方法は以下のと おりである。まず、プロテアーゼ切断部位近待な どの所望の郎位のアミノ兼配列を新たな結婚の付 加が可能となるように改変した変異ポリペプチド をコードする DNA を超換え DNA 技法により構 築する。次に、そのDNAを発現ペクターに組み 込んだものを微生物(酵母やカピなど)または動 物細胞(CHO細胞やナマルバ細胞など)に導入 し、発現させることにより、新たな結婚の付加し たポリペプチャを得ることができる。 Nーグリコ シド結合型管鎖を付加しようとする際には、糖剤 付加部位にNーグリコシド結合部位(Asn-X ーSer/Thr:XはPro以外の任意のアミ ノ散)が生じるように改変すればよい。変異ポリ ペプチドをコードするDNAの構築は、部位特集 的変異や合成DNAリンカーを使用して行うこと

ができる。

また、智慧の機能はその構造に大きく依存して いる。したがって、付加する蓄積の構造を変化さ せ、より優れた性質を付加する雑細を選択するこ とも重要なことであり、本発明はこうした最適化 の道程をも合むものである。若線の構造を変化さ せる方法としては以下に示すようなものがある。 1) 蛋白質を生産させる宿主を変える。2) 上記 の組み換え体プラスミドを含有する微生物または 動物細胞を、1ーデオキシノジリマイシン、1ー デオキシマンノグリマイシン、スワインソニンな どの結構の生合成あるいはプロセッシングに係わ る酵素の阻害剤を含有する培地で培養する。3) 猫額付加タンパタを、シアリダーゼ、B-ガラク トンダーゼ、8-N-アセチルグルコサミニダー **ゼ、B-マンノシダーゼ、エンドグリコンダーゼ** 等の各種グリコンダーゼや、シアル酸トランスフ ュラーゼ等のグリコシルトランスフェラーゼで処 理する。

本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリ

ペプチドがhG一CSP、UKおよびt-PAで ある場合についてさらに具体的に説明する。

(1) 本発明のポリペプチドまたはダリコシル化ポリペプチドがAG-CSPである場合:

組換えDNA技法を用いて大腸値で生産し、構製 したねGICSFおよびねGICSF房準体ねG -CSP (ND28) (参考例18参照) を用い ての解析からhGICSFの成熟ポリペプチャの N末端より144番目のフェニルアラニン (Phe) 概義の後が、キモトリプシンによって分解されや すいことが明らかとなった。またhGICSF 【ND28】に関しては、N末線の4~7アミノ 敵鉄基が種々のプロテアーゼ (ズブチリシン、キ モトリプシン、トリプシンなど)によって切断さ れやすくなっていることも判明した。なお b G ー CSF [ND28] は、大路線で生産、特製した 成熟hG-CSPに比べて、活性が上昇している ことが知られている。上述したような知見から、 h G - C S F 【N D 2 8】のN末蛙に近い部分お よびN末端より144 目付近がポリペプチャの

表面に存在していることが機定される。そこで トGーCSP【ND28】のN末端より6番目あるいは145番目のアミノ酸酸基に磁線を付加のN をことを試みた。トGーCSF【ND28】のN 末端より6番目のアミノ酸機基に極端付加部位を 持つ誘導体がトGーCSF【ND28N6】でありN末端より145番目のアミノ酸機基に懸備的である。 りN末端より145番目のアミノ酸機基に懸備的 加部位を持つ誘導体がトGーCSF【ND28N 145】である。この場合、糖油の付加によりア ロナアーゼ抵抗性の獲得が期待される。またポリ ペプチドの安定化により、血中でのタリアランス が遅くなることも期待される。

本発明で用いたhG-CSF、hG-CSP
[ND28]、hG-CSF (ND28N6]およびhG-CSP (ND28N145)のアミノ酸配列は、それぞれ第1表、第2表、第3表および第4表に示した。

第 1 表

第 2 表

第3表

第 4 表

本発明では、hG-CSP、hG-CSF (N D28), hG-CSF (ND28N8) ** U bG-CSP[ND28N145] をそれぞれコ ーとするDNAを紙換えDNA技法により編纂し、 載接え発現ペクターに組込んだものを動物細胞に 導入し、発現させることにより、hG一CSP、 hG-CSF (ND28), hG-CSF (ND 28N6] # # U h G - C S F (N D 2 8 N 145] を生産することができる。 このようにして扱られ るポリペプチャのうちhG-CSF[ND28N 8] およびhG-CSF (ND28N145) だ おいては、生産される全もG一CSPの約 1/3に 新たな糖類(N-グリコシド結合型糖類)が付加 している。またhG-CSF[ND28N8] お よびh G - C S F [N D 2 8 N 1 4 5] について、 新たな着幼の付加したものと付加しなかったもの とのプロテアーゼ感受性を比較したところ、新た な窘頓の付加したものの方がプロテアーゼ抵抗性 になっていることが判明した。また、トGICSP 【ND28N6】においては、新たな糖油の付加

したものは、それを酵素的に酸素したものに比べて熱に対して実定であることも判別し、本発明の有効性が示された。なお、動物報格で発現させた bG-CSP(ND28)には新たにローグリコ シド結合が付加することも明らかとなっている。 この場合も新たな着様の付加したものの方がプロ ナアーゼ芸気性になっている。

図 本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがUKあるいはも一PAである場合:

現在使用されている血栓溶解剤としてはウロキナーゼ(UK)およびストレプトキナーゼ(SK)があるが、これらの血栓溶解剤は血栓成分のフィブリンに対する類和性を育していない。そのため、血栓を溶解させるには多量投与が必要であり、また血栓に吸着したプラスミノーゲンだけでなく血中のプラスミノーゲンも活性化することにより、全身破溶の亢進が起こり、出血傾向が現れる。これらの血栓溶解剤に対し、フィブリン類和性を育する組織プラスミノーゲン活性化因子(tーPA)とUKの不活性型前駆体であるプロウロキナーゼ

(pro-UK) が最近注目を集めている。

tーPAはフィブリン観和性を有するために、血栓に特異的に吸着し、効率よく血栓を溶解すると同時に、全身の破坏亢進も出現しないことが期待される。tーPAには1本値型と2本値型に変換される。2本値tーPAが活性型であるが、1本値tーPAと同等のフィブリン溶解活性を示す。1本値tーPAと2本値tーPAのフィブリン溶解活性を示す。1本値tーPAと2本値tーPAのフィブリンのでは初せている「ティト(Tate)らにパイオケtストリー(Biochemistry)28,338(1987)]。したがって、1本値tーPAの方が血栓に対する特異性が高く、2本値tーPAより優れているといえる。

一方、UKにも1本級型と2本級型が存在し、 プラスミンにより不活性な1本級UKから活性型 の2本級UKに変接される。この不活性な1本級 UKはpraーUKとも呼ばれる。この不活性な 1本領UK、すなわちpro-UKはトロンピンというプロテアーゼが存在すると、活性を失った2本類型のUKに変換されてしまう[イチノセ(Ichinose) ら: ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミスト 9 - (J. Biol. Ches.) 261 .3488 (1986)] [グアピィチ (Gurewich) とパネル (Pannell): ブラット (Blood) 69 .769(1987)]。このトロンピンに対する感受性はpro-UKにとって不利な性質である。

上述のように、血栓体解酵素であるτーPAおよびproーUKは、プラスミンやトロンピンなどのプロテアーゼの作用により不利な型に変換してしまう。そこで、本発明においてのべた方法を用いてこれらのプロテアーゼロ新部位の近待に移類を付加し、これらのプロテアーゼに対する感受性を低くすることができれば、より優れた血栓体解酵無になることが原件できる。このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に変換し、このAsn銭基に

S1をコードするDNAならびに成熟型pro-UKの153季日のLeu残器をAsπ機器に制 換し、かつ155季日のPro機器をThr機器 に配換し、このAsn機器にNーグリコンド結合 型體線を導入した誘導体UK-S3をコードする DNAを機等した。

なお、本発明で用いた天然型proーUK, U KーSlおよびUKーS3のアミノ酸配列は、それぞれ第5表、第6表および第7表に示した。

₩

10 10 20 70 10 Admansicriforgeterity of the state of the

160 70CAACTGCCCAAGAAATTCGGAGGGGGGGCGTGTBAAATAGATAGTCAAAAGCTGGTATBAGGGAAAAGC CyaabaCyapfalyspagaydjahiscysgiuilaasplyssgiujigasyajuilaasplyssgiujitytsiugiyasgi

Tietrafeateffie and the transfer accordance control of control of

1136 Institute of the control of th

1910 TCTGCCAOGAAACTCAOGGGACCCCTCGTCTGTCCCCCAAGGCGCATGACTTTGACTGGAATTGTGAGG 8erCysOlnglyAspSerGlyGlyFroLeuvalCysSerLeuGlgGlyArgHelThrLeuthrGlyIleYslSer AGTCACACCAAGGAAGAGAATGGCCTGGCCTCTGA Sernisthelysgiugiuasagiyleuaigleu***

10 ASCAATGAACITCATCAAGTICCATCGAACTGTEACTGTCTAAATGGAGGAACATGTBIGTCCAACAABTACTTC Seraimbiulgumissinvaiproseraimcyinippilgaagtygiytarcyswaisaraimtyifyrhe 160 TATSAESESAATGETEACTITTACCSAGAAASEGCASCACTBACACEATSGGCGSGCCTGCCTGCACCTTGGAAC Tyrsluslyasgilyhispaslykispaslykyalassathraspthymatslyargprocyslasprotpasa 88 TCCAACATTCACTGGTGCAACTGCCCAAGAAATTCGGAGGGGGGGCGCTGTGAAATAAGTCAAAAACCTGC SepabbiloniittpCysaagaysProlyslysPacGiysDanisCyglbilibabblysGryfDrCys 110 Tactecaegaacccaacaacccaacccaacccaatectatetacaetebecctaaaececttateccataae Tyfcysatgaaptaaptaatgatgatgatetpecystytvatetavesblyteulysffeleutesblings 185 TGCATGGTCATGACTCCCCAAATGGAAAAGCCCTCCTCCTCCTCCACAATTAAATTTCAGTGTGGCAA Cyshelvainiaaspcysalaaspclylyslysproseraerbrobregiugiotaulyspagiacysgiydia - 460 Aaractigagececcetitaarattattegggagaaraacceccaecaecaecaectestteggece Lystrieuargproargpaelysiisiigelyelysiigil<u>aet</u>tetiigeluarssiispparaisals 518
ATCTACAGAGCACCGGGGGCCTCTGCCACCTACGTGTGTAGAGGCAGCCTCATCAGCCTTBCTGGGTGATC
IleTyrArgarguisArgGiyGlyserfellarfyralCya&iyGlybertauile3efyrofyetlla 610 AGGCCAACACACTCCTTCATTACCCAAAGAAGGACTACATCGTCTACCTGGGTGGCTCAAGGTTAAC Seralatarhiscyspaliaasply-prolyslysblaasplyrilavaltyrauglyargsbrarglauas 485 745 TECAACACECARGGGAGIGAAOTITAAGGIGGAAACCICATCCTACAGGACIACAGGGCIALAGCETT Serkentbreinstyelumetlysbagiutaliblukenteulieleukistyskaptysserklakspibriee -410 6A8ANTITACCBACTATTCTATCCBABAGCTSAAATQACTSTGTGAAGCTGATTTCTCACCBGGAFTET 81uAsnSetthtasptyteutytptogtugineltythetthrysitelbysteutisserHisArgGiuCys 1040 TCCTGCCGGGGGACCTCATCTGTCTTCCCTCCAAGCCGCATGACTTTGACTGGATGGTGACC SerCysGlasiyAspSerGiyGiyPre(ew?alcys?erleublaciyArgheqtarleathr6iyilevaiser 1135 TGGGCCTCGATTGGCCCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACAGGAGTCTCAGATTTTTACACTBATTCGL TFG81yAFG81yCyaAialeclysaiplyFpractyrthaagyaisgarbisbelewFreTff11aa 985 1035 1046 Carcarcececetracranarchecaranarectatotrectraececrespreadamanana Bingimptomistytypelysetelwelthelberyshaleleueyshlanighpfoolmitplystbenes

- 465 -

本発明では、proーUK、UK-S1および
UK-S3をそれぞれコードするDNAを超換え
DNA技法により標準し、超換え発現ペクターに
組み込んだものを動物細胞に導入し、発現させる
ことにより、proーUKならびに新たな経線が
付加されたUK-S1およびUK-S3を製造す
る。このようにして得られたproーUK、UK
-S1およびUK-S3の性質を比較したところ、
UK-S1およびUK-S3は天然型proーUK
に比べ、トロンピンに対する感受性が低くなって
いることならびに血中安定性、急安定性が向上し
ていることが判明し、本発明の有効性がUKの場合においても示されている。

本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがトGーCSF、UKあるいはモーPAである場合、トGーCSP、UKあるいはモーPAをコードするDNAとしては、トGーCSP、UKあるいはモーPAをコードするメッセンジャーRNAから組換えDNA技法で逆転写して得られるCDNA、製色体DNAから得られるトGー

とができるが、具体的にはプラスミドptPA7中のヒトtーPAcDNAあるいはプラスミドpUK1あるいはpUK11の中のヒトUKcDNAを用いることができる。ptPA7、pUK1、pUK11は、本発明者によって製造されたものであり、その製造技は参考例1、2、3に記載されている。pUK1とpUK11中のヒトUKcDNAはM13ファージを用いたディデオキシ・シータエンス (dideoxy sequence) 法により決定した。

pUK1とpUK11の中のヒトUKcDNA はともに完全なpro-UKをコードしていない が、それぞれのcDNAの塩基配列は第5表に示 す塩基配列の一部と一致している。

なお、ptPA7を含む大師選は <u>Bacherichia</u>
coli BtPA7(PBRN 8P-1467)として、pUK1を含む大師選は <u>Bacherichia</u> coli BUK1 (PERN 8P1463)として、およびpUK11を含む大師選は
<u>Pacherichia</u> coli BUK11(PBRN 8P-1484)として、
工業技術製造生 工業技術研究所(微工研)に昭

CSF、UKあるいはtーPAをコードするDNA、 hG-CSF、UKあるいはtーPAをコードす る合成DNAなどが利用できる。

AG-CSFcDNAとしては、AG-CSFをコードしているものであればいかなるものも用いられることができるが、具体的にはpCSF2を用いることができる。pCSF2は、本発明者によって製造されたものであり、その製造法は参考例4に記載されている。

pCSP2中のhG-CSFcDNAは、M13ファージを用いたディデオキン・シークエンス (dideoxy sequence) 法 (ジェイ・メシング (J. Messing) ら: ジーン (Gane) 19, 269 (1982) 〕により決定された。pCSF2中のhG-CSFcDNAはシグナル配列の一部を欠いているが成熟蛋白質部分は完全に含んでいる。成熟蛋白質部分の塩素配列を第1表に示す。

ヒトゥーPAcDNAあるいはヒトUKcDNA としては、ヒトゥーPAあるいはヒトUKをコー ドしているものであればいかなるものも用いるこ

和62年9月3日付で寄託されている。

カGーCSP、UKあるいは・ーPAをコードするDNAを組込むプラスミドとしては、大路臨または動物網絡ではDNAが発現できるものなら、いかなるプラスミドも用いることができる。好ましくは、大路鹿内でカGーCSP、UK、あるいは・ーPAを発現させるには、適当なプロモーター、例えば、1 rp系、1 a c系のプロモーターの下波に外来DNAを挿入することができ、しからシャインーグルガーノ配列(以下SD配列と応起する)と関始コドン(ATG)の間を適当とアラスミドを開えば6~1 8 塩基に調整したプラスミドを開いることができる。具体的に好適なアラスミドとしては、本発明者らによって遊成されたpKYP10(特別昭58-110800)、pTrS33(参考例5)などがあげられる。

また、AG-CSF、UK、あるいはt-PA をコードするDNAを動物細胞で発現させる際に 用いるプラスミドとしては、動物細胞ではDNA を発現できるものならいかなるプラスミドも用い ることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えばSV40初期プロモーター、SV40 使用プロモーターなどの下夜に外来DNAを挿入 することができ、しかも、ポリAシグナル、スプ ライシングシグナルなどを有するプラスミドを用 いることができる。

具体的に好速なプラス;ドとしては、本発明者 らによって遊成されたpAGE103 (水上ら:ジャーナル・オブ・ペイオケミストリー(J. Biochem.)。 101、1307~1310(1987)]、pSEIPAI-9A やpSEIPAISEIdh「rI-9A(参考 例3)などがあげられる。

pAGE103を含む大協菌は Becherichia coli EAGE103 (FERM BP-1312) として昭和82年3月23日付で数工研に客託されている。また、ジヒドロ葉酸量元群業(以下 d b f r と略記する) 遺伝子を選択マーカーとして有するプラスミドとしては、例えば、pSV2ーd b f r (エス・サブラマニ(S. Subramani)ら:モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジ

ル化ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体プラスミドを造成する例を以下に述べる。

まず、hG-CSF的媒体hG-CSF(ND28)(参考例18参照)を動物和胞で発現させるための組役之体プラスミドpAS28を造成する例を述べる。

第5回に示したようにして、pAS3-3(参
今例10)をM1uleApaLlで切断後、約
3.0 KbのDNA断片を特製する。また同プラスミ
アをAatIleMlulで切断後、約6.3 KbのD
NA断片を特製する。一方、pCfBD28(参
今例16参照)をAatIleXholで切断後、
約0.3 KbのDNA断片を特製する。これら3つの
DNA断片と第5回に示した合成DNAをT4D
NA9ガーゼにより結合し、pAS28を得る。

次に、hG-CSP(ND28)のN末婦より 第6 目のアミノ酸残基にN-グリコシド結合型 額額の付加部位を有する新規 hG-CSPプラス ミドをコードする組換え プラスミドゥASN8 ィ (Not. Cell. Biol.) <u>1</u>. 854(1981)] などが あげられる。

トGーCSP、UKあるいはモーPAの新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドをコードするDNAとペクターDNAとの組接えは、制限酵素を用いて両DNAを消化後、T4DNAリガーゼを用いて結合する一般的組接えDNA技法を用いて行うことができる。結合に際しては、制限酵素を用いて消化したDNA断片の末端を、DNAポリメラーゼ I・クレノー断片を用いる埋め込み反応または削り込み反応を利用して加工する方法やDNAリンカーを用いる方法によっても行うことができる。

h G - C S F c D N A を持つプラスミ Y として p C S F 2 を p r o - U K c D N A を持つプラス さ Y として p U K 1 1 を用い、ま た必要な場合には、化学合成した D N A リンカー や配位特異的変異を用いて、h G - C S F、および U K の新規ポリペプチ Y あるいは新規グリコシ

を遊成する例について述べる。

第6図に示したようにして、pAS3-3をM1uIとApaLIで切断後、約3.0 KbのDNA断片を構製する。また、pAS28をXhoIとM1uIで切断後、約6.5 5 KbのDNA断片を構製する。これら2つのDNA断片と第6図に示した合成DNAをT4DNAリガーでにより結合し、pASN6を得る。

次に、 h G - C S P (N D 2 8] のN末端より 第145 等目のアミノ酸鉄路にN - グリコシド結 合豆装練の付加部位を有する新規 h G - C S F ポ リペプチドをコードする組換え体プラスミド p A S N 145 を遊成する例を述べる。

pASN145の遊成は節位特美的変異を用いて行う。第7(1)図に示すように、pCfBD28をPvuIとBamHIで切断後、約0.94KbのDNA断片を特製する。また、MI3ファージベクターのMI3mp19RPDNAをSmalとBamHIで切断後、約7.24KbのDNA断片を特製する。こうして、られる2つのDNA断片を

特別平2-227075 (18)

T4DNAリガーゼにより結合し、pt19BD 28Cを得る。ついで、このpt19BD28C を大路部JM105にトランスフェダションし、 得られたファージより一本舗pt19BD28C を得る。同じ第7(U)図に示すようにして、M 1 3 mp 1 9 R P D N A & H.i n d II & E c a R I T 切断後、約7.2 KbのDNA断片を精製する。この 約7.2 KbのDNA販片と上記で得られた一本組 pt19BD28Cを混合し、変性処理の後異び アニールさせることによりギャップト・アュプレ ッタスDNAを生成させ、これを精製する。つい で、このギャップト・デュプレッタスDNAに包 7の図に示した合成 DNAモアニールさせた後、 クレノー断片とT4DNAリガーゼにより迅状化 する。この選状化DNAを大腸回JM105株に トランスフェタションし、部位仲昇的安異が導入 されたptl9BD28CN145を得る。

次に第7四回に示すようにしてpt19BD28 NCN145をBg&IとBamHIで切断後、 約0.85kbのDNA断片を物製する。一方、

ド型結構を付加したUK誘導体UK-S1を動物 細胞内で発現する組換え体プラスミドpSE1U KS1-1 dを造成する例を述べる。

第9回に示したようにして、pUK1 (参考例2)をPstIとBamHIで切断した後、890bpのDNA断片を構製する。一方、M13mp18RPDNA (ヤニシューペロン (Yanisch-Perron)ら: ジーン(Gene) 33 .103(1985)]をPstIとBamHIで切断した後、約7.2 KbのDNA所片を構製する。このようにして得られる両DNA断片を構製する。このようにして得られる両DNA断片をT4DNA9ガーゼにより結合し、UK・cDNAの一部をM13mp18ペタターにサブクローン化したプラス・1 Pp UKmpS1を得る。

次いで、常供によりpUKmpS1の1本類 DNAを研製した後、第10世に示したようにし て、UKの184番目のアミノ教教器にNーグリ コシド型糖額が付加されるように塩基配列を変え る。すなわちPhe-164をAsnに変換するた めの合成DNA 5'-GGGGAGAAAACA CCACC-3'とM13mp18のDNA塩基配 pC!BD28をBamH!とBg!!切断後、 的3.25 kbのDNA断片を 製する。こうして得 られる2つのDNA断片を各々T!DNAリガー せで結合することにより、pC!BD28N145 を得る。

次に、同じ第7四回に示すようにして、pCfBD28N145をBan回とBamHIで切断後、約1.3 KbのDNA断片を精製する。こうして存た約1.3 KbのDNA断片を見せる「で切断後、DNAボリメラーゼ・クレノー断片で処理することにより突出来端を埋め、さらにAatIで切断後、約0.2 KbのDNA断片を精製する。また、pAS28をAatIEとXhoIで切断後、約0.8 KbのDNA断片を搭製する。また、pSE1PA1SE1dhfrl-9A(参考例9)をSmaIとXhoIで切断後、約8.7 KbのDNA断片を精製する。こうして得た約0.2 Kb、約0.8 Kb、約8.7 Kbの3つのDNA断片をT4DNAリガーゼで結合することによりpASN145を得る。

次に、トロンピン切断部位近傍にN-グリコシ

列決定用の合成DNA

5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' をプライマーとして、pUKmpS1の1本額 DNAを大島田DNAポリメラーゼス・クレノー 新片により2本額DNAに変換すると同時に、所 望の位置に変異を導入する。このようにして変異 を導入した2本組DNAをPet『とEcoR『 で何斯した後、約600bpのDNA籔片を精製す る。一方、UK・cDNAを選ぶpUK11 (参 考例3)をAat『とPstlで切断した後、約: LOKbのDNA断片を構製する。また、UK・ cDNAの3′末韓個にKpnIサイトを導入した pUKB101(参考例12)をAatILEcoR 【で包断した後、約2.9 KbのDNA能片を接触す る。このようにして得られる3種類のDNA断片 をT4DNAリガーゼにより結合し、UK房塚体 びKーSlをコードする組換え体プラスミドpU KS1を扱る。

続いて、第11回に示したようにして、遺伝子 増幅用のdh(r遺伝子を持つ外来遺伝子発現ペ 99-

pSE1PA1SEIdhfr1-9A(考例 9)をKpniとXhoIで切断した後、約8.8 KbのDNA断片を精製した。一方、UKを発現する組接え体プラスミソpSE1UKpro1-1 A(参考例13)をXhoIとBglIで切断した後、約0.75kbのDNA断片を精製した。また、UK-S1をコーソするpUKS1をKpniとBglIで切断した後、約1.15kbのDNA断片を構製する。このようにして得られる3種類のDNA断片をT4DNAリガーゼにより結合し、UK-S1を発現しうる組接え体プラスミソpSE1UKS1-1dを得る。

同様にしてUK-S3を発現しうる組換之体プラスもドゥSEUKS3を得ることができる。

上記組換え技法における反応の条件は、一般的 に下記のとおりである。

DNAの制限辞書による消化反応は通常 0.1~2 0 mg の DNA を 2~2 0 0 mil (好ましくは 1 0~40mil) の Tris - HC & (pH6.0~9.5 好ま

[10mk Tris 一HC & (pHT.5)、1mk EDTA] および二倍量のフェノール(TE 級衝液で飽和したもの)を加え、混合した後、一70℃と6・5 ℃での液結一般解を2回級り返し、さらに遠心分離によって生じる上腺の水体液を分取し、エタノール
沈殿によってDNA断片を回収する方法である。
DNA断片回収機・マックスイールドAE - 3241型(アトー株式会社製)を用いて、アガロースゲルやボリアクリルアミドゲルからDNA断片を電気水動によって溶出し、精製できる[以下、この方法を電気水動的溶出法(electro-eletion)と時春する]。

DNA所片の結合反応は、2~200ml (好ましくは10~40ml) のTris-HC& (pH6.1~9.5、好ましくはpH7.0~8.0)、2~20ml (好ましくは5~10ml) のMgC&。、0.1~10ml (好ましくは0.5~2.0ml) のATP、1~50ml (好ましくは5~10ml) のジチオスレイトール (以下DTTともいう) を含む反応被中で、T4DNAリガーゼ1~1.000単位を用い、

しくはp87.0~8.0)、0~200mMのNaCl、2~20mM (行ましくは5~10mM) のMaCl。を含む反応被中で、制限酵素の1~100単位 (行ましくは1 MのDNAに対して1~3単位) を用い、20~70で(至適温度は用いる制限酵素により異なる)において、15分間~24時間行う。反応の停止は、過常55~75でで5~30分間加熱することによるが、フェノールまたはジェチルピロカーボネートなどの試薬により制限酵素を失活させる方法も用いることができる。

制限酵素消化によって生じたDNA断片あるいはギャップト・デュブレックスDNAの精製は、低量点アガロースゲル電気放動法(以下、LGT 法と略記する)[エル・ウィスランダー(L. Nieslander):アナリティカル・バイオケミストリィー(Analytical Biochemistry) 98, 305(1979)] あるいはアガロースゲル・液結酸解法(以下、AFT法と略記する)を用いて行うことができる。このAFT法とは、DNA断片を含むアガロースゲル(0.7~1.5%)のスライスに対して、等量のTE級衝波

1~37℃ (好ましくは3~20℃) で15分間~72時間 (好ましくは2~20時間) 行う。

結合反応によって生じた組換え体プラスミド
DNAは、必要によりコーエンらの形質伝検法
[エス・エヌ・コーエン(S. N. Cohen) ら:プロ
シーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミ
イ・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)、
USA. 69. 2110(1972)] あるいはハナハンの形質伝検法 [Hanahan : ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 168. 557
(1983)] を用いて、大路館に導入する。

結合反応によって生じた組み換え体M 1 3 ファージR F D N A は、必要により公知のトランスフェタション法【口野島幸ら:蛋白質・核酸・酵素29 ・ 294 (1984)】によって、大肠歯 J M 1 0 5 株 (ジェイ・メシング (J. Hessing) ら:ジーン (Gone) 33 、103 (1985)】に導入する。

祖後え体プラスミドDNAおよび包み後え体M 13ファージRPDNAを持つ大幅密から旋DN Aの単離は、パーンポイムらの方法(エイチ・シ ー・パーンポイム (H.C. Birsboim) ら:ヌクレイッタ・アシッド・リサーチ (Mucleic Acids Res.) 7、1513(1979)] などを用いて行う。

組み換え体M 1 3 ファージからの一本額 D N A の単純は公知の方法 [口野喜申ら:蛋白質・核酸・酵素 29 、294 (1984)] に従って行う。

本発明で使用するデオキシオリゴスタレオチドは、リン酸アミダイト法による固相合成法 [S.L. Beaucageら:テトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Lett.) 22. 1859(1981)]、および L. J. BcBrieら:同24. 245(1983)] に従い、アプライド・バイオシステムズ社 380A・DNA合成機 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA 94404]を用いて合成することができる。合成されたデオキシオリゴヌクレオチドを他のDNA版片と結合させる反応に用いる場合には、約20ピコモル(pmoles)のデオキシオリゴヌクレオチドを20㎡のT4キナーゼ級衝液 [50mil Tria-HCL(ph 7.6)、10mil MgCL。、5mil DTT、0.1mil EDTA、0.5mil ATP)中で、5単位のT4

プラスミド (例えば p C f B D 2 8 N 1 4 5) を用いて大阪的 K - 1 2 M M 2 9 4 株 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 73 . 4174, 1976) を形質伝換させ、アンピシリン耐性 (Ap' 以下同じ) のコロニーの中からp C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪的を選びだす。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪的を選びだす。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪的を選びだす。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪的を選びだす。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪のではないです。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪のではないです。p C f B D 2 8 N 1 4 5 を有する大阪のではないでする。

ここで用いる培地としては大協歯の生育ならびに新規トG-CSFボリベプチドの生産に仔遺なものならば合成培地、天然培地のいずれも使用できる。

世書類としては、グルコース、フラクトース、
ラクトース、グリセロール、マンニトール、ソル
ピトールなどが、選書面としては、NHaC &、(RHa) aSO。、
カデミノ酸、即母エキス、ポリペプトン、内エキ
ス、パクトトリプトン、コーン・スティーブ・リ
カーなどが、その他の栄養剤としては KaBPO。
KHaPO。、NaC & 、NgSO。、ピタミンB 。 NgC & a

プラスミドDNAの構造解析については、プラスミドDNAを1~10種類の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動により切断部位を顕べる。さらにDNAの塩基配列を決定する必要があるときはW13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス(dideoxy sequence)法によって決定する。

本発明のポリペプチドおよびグリコシル化ポリペプチドは大陽間あるいは動物細胞を宿主として用いることにより、以下のようにして製造することができる。

ます、大阪店を宿主として新規 h G - C S F ポリペプチドを生産する例について述べる。

などが使用できる。

培養はpH5.5~8.5、温度18~40でで通気 複辞培養により行われる。培養5~90時間で培 養菌体中に新規 h G - C S F ポリペプチドが審験 するので、培養物から関体を集酷し、関体を超音 被処理により破砕し、減心して再られる関体技権 を得る。この関体技権からマーストンらの方法 〔P.A.0、Nareton ら:810/TECBROLOGY 2.800 (1984)〕あるいはペニカらの方法〔Pennica et al.:ネイチャー(Nature)301,214(1983)〕、ある いはウィンタラーらの方法〔Winkler et al.:パ イオ/テクノロジー(810/TBCHNOLOGY)3.990 (1985)〕を用いることにより、新規 h G - C S F ポリペプチ Y を抽出・模型・可称化・再生することができる。

次に、動物額商を宿主として新規 h G - C S F ポリペプチ Y あるいは新規 h G - C S P グリコシル化ポリペプチ Y を生成する方法について述べる。

新規 h G - C S P ポリペプチドあるいは 担 h G - C S F グリコシル化ポリペプチドを発現さ せる際の 主としては、抜ポリペプチドあるいは 抜グリコシル化ポリペプチドを発現できるものな らいかなる動物細胞も用いることができる。具体 的に好道な動物細胞としては、d h f r が欠損し た CHO細胞 [ジー・ウルラウブ&エル・エー・チェイシン(6、Urläch & L. A. Chasin): Proc. Matl. Acad. Sci., USA. 17, 4216(1980)] など があげられる。

以下に、新規 h G - C S P を発現しうるプラス
ミドとして p A S N B 、 宿主として d h f r を欠 類した C H O 細胞を用いて新規 h G - C S F ポリ ペプチドあるいは新規 h G - C S F ダリコシル化 ポリペプチドを製造する例を述べる。

プラスミドゥASN 6 を例えばリン酸カルシウム性 [グラハム&ファン・デル・エブ (Graham & Van der 8b):ヴィロロジィ (Virology) 52 , 546 (1978)] によりdh fr 欠損CHO株に導入する。 PASN 6 を有する形質伝接株は例えばG418 および透析ウシ胎児血済を含むMEM ALPHA 培地 (りポ核酸およびデオキシリポ核酸不会者:

メンターなどを用いることができる。培養は、通常種類的密度 5 × 10 °~ 1 × 10 °細胞/elとし、30~40℃、2~10日間行うと、各細胞密度に応じ、本発明物質が主に細胞外に分泌される。 培養物から細胞を進心験去し、遠心後の上清から新規 h G - C S F グリコシル化ポリベブチ P を分離抽出する。

以上、トGーCSFの場合について、大阪図あるは動物和助を留主とした新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドの製造法について述べたが、UKあるいはその他の任意の蛋白質の場合も同様に製造することができる。

また上配のようにして得られた h G - C S F 活性の制定は以下のように行う。

8~12選令のC3H/He 建マウス (静岡実 鉄動物協同組合) の大腿骨より骨質細胞を振露的 にとり出し、牛舶児血清 (FBS) を10%添加 したαーWinimum Essential Medium (Plow Laboratories, 以下αーMEM培地と す)に怒 ギブコ・オリエンタル社会)により選択することができる。さらに悪質転換様の中からメソトレキセートを用いて新規トG一CSFボリペプチド選伝子が増幅された思質転換様をあこともできる。 得られた悪質転換様を培地に培養することにより培養物中に新規トG一CSFがリペプチドあるいは新規トG一CSFグリコシル化ポリペプチドを生成させることができる。

培地としては、各種血清(例えばウシ胎児血清)を加えたハムド10培地、ハムド12培地(以上フローラボ社製)、ダルベッコMEM培地、RPNIー1640培地(以上日水製薬社製)、MEMALPHA培地およびこれらの混合培地が用いられる。培地には必要により、グルタミン0.5~5ml、抗生物質【ベニシリン(25 U/al)、ストレプトマイシン(25 m/al)、G 4 1 8 (0.3 ml/al) など こ、実質(0.01%)などを適量加えてもよい。

特美には、種々の培姜ピン、ディッシュ、ロー ラーボトル、スピンナーフラスコ、 ジャーファー

周する。この細胞(約5×10.1個) 懸局放1.5 mlを、ナイロン・ウール(Nylon wool)(和光純素、Nylon Fiber 146-04231)をつめたカラム
(0.3 g) に浸漬し、5%CO。インキュペーター内にて37で90分間反応させる。次いで予め37でに加温したαーMEM培地をカラムに流し、辞出してくるナイロン・ケール非吸着性の骨健細胞を容る。この細胞をαーMEM培地で一回洗浄し、所定の温度に顕整する。

次いで、関部らの方法 (Okabe T. et al., Cancer Research 44、4503-4506(1986)) に単じて骨食 盗血幹部的コロニー形成能を測定する。すなわち、αーMEM 0.2 ml、FBS 0.4 mlおよび 2 及 随種釈した各サンプル0.2 mlの混液に、上記の方法で類裂した骨質細胞 (2×10° 個/ml) の0.2 mlを提和する。これに 4.2 でに保温した 0.6 % 等 天 (Oifco, Agar purified \$ 0560-01) 体液を等量 (1.0 ml) 混和し、その 0.5 mlを 2.4 穴マルチディッシュ (Hunc社製、\$ 143982) に発程する (5×10° 個/dish, n = 3)。5% CO。イ

ンキュペーター中で37℃7日間 美し、40個以上の細胞からなるコロニーの数を類数線 (Diyapus 社製、140)で計数する。コロニー計数後、注意深 (スライドグラス上にとり出し、アセトン・ホルマリン及液で30秒間固定後、Kubotaらの方法 (Kubota K. at al., Sxp. Hematology. 8. 339ー344 (1980)]でエステラーゼ2重数色を油し、各コロニーの同定を行う。

各サンプルの力値は、コロニー形成試験の2段階級駅に於ける計数結果から以下の様に算出する。スタンダードとして用いたインタクトGーCSFのコロニー形成の最大値の外値を与える活性を50単位と定義し、これに各サンプルの様根率および単位=1当りの活性に検算するため、20を乗じて力値(単位)とする。比話性は、単位蛋白質(ng)当りの力値(単位/ng)で表示する。

また、hG-CSFの蛋白質量は、抗hG-CSF単クローン抗体を用いたエンザイム・リンクト・イムノ・ソルベント・アッセイ(ELISA)によって求める。なお、このときの標準物質とし

では、大師館で生産、精製し、ローリー法によって定量したトGICSF提品を用いる。また杭トGICSP単クローン技体は、花井らの方法(花井ら:キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)。46. 4438(1986)] に従って調製したものを用いる。 tーPAまたはUKの活性はフィブリン・プレート・アッセイ法(Granelli-PipernoとReich: ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Ned.) 148, 223(1978)) によって測定することができる。

以下、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがトGーCSPまたはUKである場合の実施例を述べる。実施例1から5は、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがトGーCSFである場合の実施例で、実施例6から13はUKの場合の実施例である。

hG-CSF誘導体hG-CSF(ND28) (参考例16参照)を動物細胞で発現するための 組換え体プラスミドゥAS28の造成(第5図参

黑) :

参考例10で得られたpAS3-3 2 成を 10mM Tris-HC2(pH7.5)、7 ml MSC1。6mM 2-メルカプトエタノール および150mM NaC2を含む緩衝液(以下 "Y-150緩衝液"と略記する)2:0 成に溶か し、制限解集M1u1(室調验社製:以下制限課 業については特記しない限りすべて室間造社製) を10単位加え、37でで2時間前化反応を行った。その後、ApaL1を5単位加え、さらに 37でで10分間部分消化反応を行った。この反 応波からしGT技により約3.0 KbのDNA断片的 0.5 成を構製、図収した。

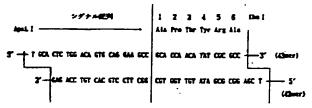
また同プラスミド2 Mを10mM TrisーHCL(pH7.5)、7mM MgCL。、6mM 2ーメルカプトエタノールおよび50mM KCLを含む緩衝液 (以下"K-50緩衝液"と略記する) 20 Mに溶かし、制限抑集Aatl(東洋紡績社製)を10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCL適度が100mM

になるようにNaClを添加し、10単位の Mlulを加え、37℃でさらに2時間反応を行った。この反応被からLGT法により約6.3 Kbの DNA断片を約1減精製、回収した。

別に、pC「BD28(参考例16参照)2 幅をK-50級衝放20㎡に溶かし、制限酵素
AatI(東洋紡績社製)を10単位加え、37
でで2時間消化反応を行った。その後、NaCよ 濃度が50mMになるようにNaCよを添加し、 10単位のXholを加え37でできらに2時間 消化反応を行った。この反応液からしGT法によ り約0.3 KbのDNA断片約0.1 収を精製、凹収した。

一方、成熟型 h G ーC S P の N 末畑のアミノ酸である T h r を A l a に、3番目のアミノ酸である L e u を T h r に、4番目のアミノ酸である G l yを T y r に、5番目のアミノ酸である P ro を A r g に変換するために、下記の D N A y ンカーを合成した。

特開平2-227075 (21)



まず、一本領DNA (43mer、2種) をアプ

ライド・パイオシステムズ社380A・DNA合

成機を用いて合成した。次に、合成したDNA

(43mer、2種) をおのおの20ピコモルずつ、

50mM TrisーHCL(pH7.5)、10

mM MsCL。、5mMジチオスレイトール、
0.1mM EDTAおよび1mM ATPを含む

提情被(以下この装価液を*T4キナーゼ級衝液
と略記する) 40㎡に終かし、T4ポリスクレオ

チドキナーゼ (宝酒産社製:以下同じ) 30単位
を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行っ

た。

上記で得た、pAS3-3由来のMlulApaLI新片(約3.0 Kb) 0.5 Mと同プラスミド由来のAatI-MluI新片(約6.3 Kb)

C. Biraboia)ら: メクレイック・アシッド・リナーチ (Ruclaic Acida Rea.) 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドDNAの単雄はこの方法を用いる) に従ってプラスミドDNAを単雄した。

得られたプラスミドの構造は、制限酵素消化およびM13ファージを用いたディデオキシ・シータエンス法により破坏した。このプラスミド PAS28 (第5 図参照) と呼ぶ。プラスミド PAS28 PERM BP-2089として昭和63年9月24日付で改工研に客託してある。故プラスミドがコードするボリベブチド(hG-CSP病体体)は、成熟型hG-CSFに比べて以下のようにアミノ酸残害が最後されている。

1.0 魔および p C f B D 2 8 由来の A a t II ー X h o I 断片 (0.3 Kb) 0.1 概を 2 0 m M T r i a ー H C 4 (p H 7.6)、 I 0 m M M g C 4 a、 1 0 m M グテオスレイトールおよび l m M A T P を含む最新核 (以下この緩衝液を *T 4 リガーゼ 緩衝液* と略起する) 2 5 威に体かし、この混合 液に上記 D N A リンカーを約1 ピコモル加えた。この混合体液にさらに T 4 D N A リガーゼ (玄福 遠社蟹:以下同じ) 4 0 0 単位を加え、 4 で、 1 8 時間結合反応を行った。

得られた独独え体プラスミドの混合物を用いて 大陽歯HB101株 [ポリパー (Bolivar)ら: ジーン(Gene) 2.75 (1977)] をコーエンらの方法 [エス・エヌ・コーエン(S. H. Cohen) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA。 69. 2110 (1972)] (以下、大陽面の形質伝接にはこの方法を用いる)により形質伝接し、アンピシリン (Ap) 耐性様を得た。この形質伝接はから公知の方法 [エイチ・シー・パーンポイム (H.

アミノ酸菌族の位置		プラスミド	
(bG-CSFØ7	マノ酸)	p A S 2 8.	
1 番目	(Thr)	Ala	
3 # 🖺	(Leu)	Thr	
4 巻目	(61y)	Tyr	
5 春日	(Pro)	Arg	
17番目	(Cys)	Ser	

PAS 2 8 がコードするポリペプチド (h G - C S P 誘導体) を以後 h G - C S F (N D 2 8)と呼ぶ。

实施例2

ト G - C S F (N D 2 8) (参考例 1 8 参照) の N 末端から第 8 番目の ア t ノ酸残基に N - グ リコッド結合型締却の付加が可能となった新規 h G - C S F ボ リペプテドをコードする組換え体プラス t ド p A S N 6 の造成 (第 8 図参照) :

考例 1 0 で得られた p A S 3 - 3 2 収を Y - 1 5 0 級衝波 2 0 減に熔かし、飼限酵素 M 1 u T 1 0 単位を加え、3 7 セで 2 時間前化反応を

行った。その後、Apallを5単位加え、さらに37℃で10分間部分落化反応を行った。この反応液からLGT法により約3.0 KbのDNA断片 約0.5 点を複数、回収した。

別に、前項で得たPAS28 2 減をY-150 銀振蔵20 以に移かし、製機酵素XhoIとMlulをそれぞれ10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT生により、約6.55 kbのDNA新片1.0 減を特製、回収した。

一方、実施例1のpAS28がコードするhG一CSF(ND28)のN末端から第6番目のア
くノ酸であるAlaをAsnに変換し、N-グリコンド結合型結婚の付加部位を形成するために下 記のDNAリンカーを合成した。下配DNAリンカー中には新たにSnaB1切断部位が生じるように設計されているため、同リンカーが組み込まれたことは制限酵業SnaB1で切断することにより確認することができる。

一ゼを加え、4でで18時間約合反応を行った。 ・超換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて、 大猫面HB101株をコーエンらの方法(約記費 により悪質転換し、Ap耐性株を得た。この形質 転換体より、公知の方法に従って、プラスミドDNAの機 を検はより、公開した。はプラスミドDNAの機 避は、制限酵素剤化およびM13・ファージ破坏の た。このプラスミドをpASN8と呼ぶ。プラス ミドゥASN8を含む機生物はEscherichia coli EASN6 PERM8P-2070として昭和83年9月24日 付で数工研に寄託してある。はアラスミド体)は、 の場面は、プラスミドをpASN8なではではない。 で数工研に寄託してある。とびアラスミドがコー ドナるボリベブチド(hG一CSF場体)は、 成熟型hG一CSFと此べ以下のようにアミノ酸 数基が転換されている。 Apail 1 2 3 4 5 6 No 1

Ala Pro The Typ Are Ass

S' + T SCA CTC TOS ACA STE CAS SAS SCC SCA CCT ACG TAT CSC AAC 3' (ASsert)

3' - CAG ACC TET CAC STC CTT CSG CGT GGA TGC ATA GCG TTG AGC T 5'

Sassi

一本類DNA(43mer、2種)はアプライド・パイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

合成したDNA (43 mer、2種) はおのおの20ビコモルずつ、40 MO T4 キナーゼ銀価液に移かし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて37 でで80分間リン酸化反応を行った。

上記で得たpAS3-3由来のMlul-ApaL 1断片(約3.0 Kb) 0.5 MとpAS28由来の Xhol-Mlul所片(約6.5 5 Kb) 1 Mを全 量30 MのT4 リガーゼ級衝液に体かし、この程 合液に上記DNAリンカーを約1 ピコモル加えた。 この混合液にさらに400単位のT4DNAリガ

アミノ酸菌族の位置	7521Y PASN 6
(hG-CSFのアミノ酸)	
1季日 (Thr)	Ala
3 書目 (Leu)	Thr
4 季目 ′ (61y)	Туг
5 #目 (Pro)	Arg
6 季 笛 (Ala)	Asn
17季日 (Сув)	Ser

P A S N 6 がコードするポリペプチド (h G ー C S P 誘導体) を以後h G ー C S P (N D 2 8 N 6] と呼ぶ。

実施例3.

hG-CSF [ND28] (参考例1.6参照) のN末端から第145番目のアミノ酸残器にNーグリコンド結合型機器の付加が可能となった新規 hG-CSFポリペプチドをコードする組接え体プラスミドPASN145の遊成[第7(1)図および第7(2)図数集項]:

(A) 特別-本級DNA (-本級pt158028C)の登成:

: :: .

pCfBD28(考例16 照) 3 Meを10 mM Tris-HCl(pH7.5)、7 mM MgCls、6 mM 2-メルカプトエタノール そかむ銀術液(以下"Y-0級循液"と 起する)20 Miに添かし、制限保索PvuIを10単位加え37でで2時間消化反応を行った。その後、NaCliggが100mMになるようにNaClieを添加し、10単位のBamHIを加えて37ででさらに2時間反応を行った。

この反応液からしGT法により、hG-CSF (ND28)のC末端部分をコードする的0.94 KbのDNA断片 (PvuI-BamHI断片)的0.5 kxを得た。

一方、M 1 3 ファージベクターであるM 1 3 mp 1 9 R F D N A (空酒造社製) 1 点を全量50 2 の Y ー 0 極密被に溶かし、制限酵素 S ma ! を 1 0 単位加え、3 7 で、2 時間消化反応を行った。その後、N a C & 漫座が 1 0 0 m M になるように N a C & を添加し、制限酵素 B a m H i を 1 0 単位加え 3 7 で、2 時間消化反応を行った。この反

広波からLGT法により約7.24KbのDNA新片 (Smal-BamHl新片)約0.8 成を得た。 上記で たPvuI-BamHl新片 (約0.94 Kb) 0.2 成と、Smal-BamHl新片 (約7.24Kb) 0.05 成をT49ガーゼ提衝波50 成に歩かし、この混合液にT4DNAリガーゼ 400単位を加え12℃、16時間結合反応を行

次に、公知の方法(メシング(Messing)ら:
メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in
Enzymology) 101 . 20(1983)〕に従い、上記反応液を用いて大幅臨JM105株をトランスフェクションし、組換え体ファージを得た。この組換え体ファージの郵換した大橋面JM105株の培養はより、プラスミドDNA回収法に単じて、組換え体M13ファージRFDNAを回収した。このRFDNA(これをpt19BD28Cと呼ぶ)の構造は、BamHi.EcoRI,Bgglで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により破認した。この組換え体ファージより、前記公

知の方法に従って一本鎮 p t 1 9 B D 2 8 C を図 取し鉢型とした。

図 ギャップト・デュプレックスDNA(Gapped Duplex DNA)の造成:

M13mp19RPDNA (空間強社製) 3 減を10mM Tris-HCL (pH7.5)、7mM MBCL。、8mM 2-メルカプトエタソールおよび100mM NaCLを全む緩衝被(以下"Y-100緩衝液"と略記する) 30 減に溶かし、制限酵素をCoR1とHind回をそれぞれ16単位ずつ加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からしGT法により約7.2KbのDNA断片(EcoRI-Hind回断片)約2.5減を得た。

このmp19RFDNA由来のEcoRIー Hind面断片(約7.2Kb) 2mと的項で得た 鋳型一本摘DNA。pti9BD28C lmを 50mM Tris-HCL(pH7.8)、7mM MgCL,および8mM 2ーメルカプトエタノ ールを含む緩衝液(以下"タレノー緩衝液"と略 記する)27世に辞かし、100七で6分間気がすることによりDNAを変性させた。その後、65七で10分間、37七で40分間、4七で40分間、水中で10分間放置し、アニール反応を行い辞型中のhG一CSP遠伝子部分だけが一本畑となったギャップト・デュブレックスDNAはLGT法により回収した。

(c) 突然変異誘発 (pt198028CX145 の造成)

実施供1で得たPAS28がコードするトGーCSF(ND28)のN来端から第145番目のアミノ酸であるGInをAsnに、第147 目のアミノ酸であるArgをSerに歴快し、Nーグリコシド結合型器線の付加部位を形成するために、以下に示す一本額DNAを合成した。下記一本額DNA中には、新たにPvuIサイトが生じるように設計されているので、突然変異が導入されたものはこれを制限配業PvuIで切断することにより確認することができる。

Asn Ser †
141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151
Ala Ser Ala Phe Sin Arg Arg Ala Siy Giy Val

5'-SCC TCT GCT TTC AAT CGA TCG GCA GGA GGG GTC -3'

Pvu I (3 3 mar)

一本頃DNAの合成は、アプライド・パイオンステムズ社380A・DNA合成機を用いて行った。合成した一本領DNA1域を50域のT4キナーゼ級形法に溶かし、T4ポリスクレオチドキナーゼ30単位を加えて37でで80分間リン酸化反応を行った。

次に、このリン酸化した 1 本類 D N A G. 2 以と 前項で得たギャップト・デュブレックス D N A 0. 1 減を 6. 5 m M T r i s ー H C & (p H 7. 5)、8 m M M g C & 。、1 m M 2 ーメル カプトエタノールおよび 1 0 0 m M N a C & を 含む装造液 3 4 以に体かし、6 5 ℃で6 0 分間、 室温で3 0 分間放置し、1 本額 D N A をギャップ ト・デュプレックス D N A に アニール させた。 この移在に d A T P 、 d C T P 、

> のDNA断片 (Bg 4 I - Bam H I 断片) を 0.4 減得た。

一方、pCIBD28(参考例16参照)2度を59度のY-100機衝波に溶かし、制限酵素BamHIを10単位加え37でで2時間消化反応を行った。その後、制限酵素BsLIを5単位加え、37でで3らに10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT法により、約3.25間のDNA断片(BamHI-BsLI断片)を0.5度得た。

上記で得たりは19BD28CN145由来のBs & I - Bam H I 断片(約0.8 fkb)0.4 成とりC I BD28由来のBs & I - Bam H I 断片(約3.2 fkb)0.5 成をT かりガーゼ酸価板(約3.2 fkb)0.5 成をT かりガーゼ酸価板の以に体かし、400単位のT 4 D N A りガーゼを加え、12でで1.6 時間結合反応を行った。 波反応波を用いた大器曲 H B 10 I 株を港質転換し、A p 耐性株を得た。 該港質転換株よりプラス * V D N A を単純し製限酵素切断により構造解を行った。目的の構造を有するプラス * V D N

d G T P をそれぞれ 0.5 m M になるように加えた 後、1.5単位の D N A ポリメラーゼ [・クレノー 断片と 4 0 0 単位の T 4 D N A リガーゼを加え、 4 で、1 6 時間の伸長反応を行った。

接反応被を用いて大腸側JM105をトランスフェクションし、変異導入ファージを得た。 変異導入ファージの感染した大腸側JM105よりRFDNAを回収し、制限酵素切断およびM13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス法により構造確認を行った。目的の変異が導入されたRFDNAをpt19BD28CN145と呼ぶ。

(4) pCfBD28N145の造成(第7(2)図 類)

前項で得たりは19BD28CN145 3 ME を50 MEのY-100級価数に体かし、制限酵素Bg&l(ペーリンガー・マンハイム社製)およびBamHIをそれぞれ10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。反応液からLGT法により、前項で導入した変異認位を含む約0.85 Kb

AをpC「BD28N145と呼ぶ。

(e) pASN145の盗成

前項で得たpC'f.BD28N145、5 kgを 50点のY-100級仮被に終かし、制限群業 Ban皿(東洋紡績社製)およびBamHlを各 々10単位加え、37℃で2時間消化反応を行っ た。この反応放からしGT法により約1.3 Kbの DNASH (Bank-Bankissh) 1mを 得た。この約1.3 KbのDNA断片 1 juを5 0 idの Y-100級衝波に熔かし、制限酵素Ddel (東洋紡績社製) を10単位加え37℃で2時間 前化反応を行った。フェノールークロロホルム等 量茂合液による抽出(以下フェノールーグロロネ ルム抽出と略記する) およびエタノール注册でり NAも四収し、30㎡のクレノー選指後に诊がし、 DNAポリメラーゼ I・タレノー断片を2単位加 える?でで1時間反応を行った。88℃で10分 間処理しDNAポリメラーゼー・クレノー斯片を 失活させ後、エタノール沈殿でDNAを回収した。 四収したDNAは、20㎡のK-50種街技に排

かし、解除非常 A a t I (東洋紡績社製) 1 0 単位を加えて37℃、2時間消化反応を行った。この反応被よりLG T 法により的 C. 2 Kbの D N A 断片 (Bde I (平坦末線) - A a t I 断片]的 C. 1 なを得た。

別に実施例1で界たpAS28の2域を20点のK-50種衝液に体かし、新限群無AatII(東洋紡績社製)10単位を加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限群業XhoIを5単位加え、37℃で3分に10分間部分消化反応を行った。この反応被よりLGT法により約0.8 KbのDNA所片(AatI-XhoI新片)約0.1 減を得た。

一方、参考例 9 で得たpS8iPAIS8idhfri-9A 2 点を 2 0 点の Y - 0 級衝液に溶かし、創限酵素 5 ma I を 1 0 単位加え、 3 7 t で 2 時間消化反 応を行った。その後、N a C 1 濃度が 1 0 0 m M になるようにN a C 1 を添加し、制限酵素 X h o I を 1 0 単位加え、 3 7 t でさらに 2 時間消化反 応を行った。この反応液からし G T 法により約8 7

放送基が配換されている。

アミノ酸運換の位置 (MG-CSFのアミノ酸)		プラス : ド p A S N 145
3 李目 (Les)	Thr.
4 李目 (61y) .	Туг
5 書自 (Pro)	Агв
17番目 (Cys)	Ser
145季日 (61a)	Asn.
147季目 (Arg)	Ser

p A S N 1 4 5 がコードするボリベプチド (h G - C S F 誘導体) を以後 h G - C S F (N D 2 8 N 1 4 5] と呼ぶ。

実施例も

h G - C S F (N D 2 8)、h G - C S F (N D 2 8 N 8)、h G - C S F (N D 2 8 N 1 4 5) およびh G - C S F の動物細胞による生産:

(1) p A S 2 8 を保育する動物細胞によるh G - C S F (N D 2 8) の生産:

KbのDNA新片 (Smal-Xhol新片) 約1

上記のようにして たpC!BD28N145 由来のDdel(平坦末端)一Aat耳斯片(約 Q.2 (b) 的Q.1.K. PAS28由来のAatI-Xhol新片(約0.8 Kb)約0.1 kg、pSEIP AlSEldhfri-9A由来のSmal-Xhol断片 (約8.7Kb) 約1 M を 3 0 M の T 4 DNAリガーゼ報告液に溶かし400単位のT4 DNAリガーゼを加え、 4 ℃で1 8 時間結合反応 を行った。彼反応被を用いて大昌歯HB101 株を 形質伝換し、Ap耐性株を得た。 放形質転換株よ りプラスミドを単離し、制模酵素切断による構造 解析を行った結果、目的の構造を有するプラスミ FDNA、pASN145を得た。プラスミド pASNI45を含む数生物はEscherichia coli BASNI45 FBRN BP-2071として昭和63年9月24. 日付で数工研に客託してある。放プラスミドがコ ードするポリペプチド(トGICSF誘導体)は、 成熟型トGICSPと比べて以下のようにアミノ

pAS28のdhfr欠損CHO株への導入はり ン酸カルシウム技に準じて行った。すなわち、 FCS10%と7.5%NaHCO。 存被 [プロ ・ラポラトリーズ (Flow Laboratories) 社製) 1/50量を加えたMEM ALPHA培地(り ポ技敵およびデオキシリポ技能合有:ギブコ・ オリエンタル社里) [以下、この培地をΜΕΜα (非選択培施)と略記する3 5 mlに 1 × 10 動 **応/mlになるように細胞を接着し【梅養には底** 径 8 cmのディッシュを使用した: L.U X 社製 (以下、培養には LUX社のディッシュを用 いた)]、37セ、CO:インキュペーケーに て1日間培養した。一方、pAS.2.8 の10gg &450 m010 mH Tris-HC & (p87.5) **参波に沙探し、この溶液に500点の280m**k NaC4. 1.5 eM Na HPO .. 50mM HEPES (N-2-EFロキシエチルピペラ ダンーN'ー2ーエタンスルフォン酸)(pH 7.1)、を含む溶液を加えて混合した。さらに50 MO2.5M CaCL。溶液を加えて混合し、

室温で5分間 置した。このDNA熔液全量を、 地を除き新しい MENα(非選択培地)10mlを加 えてさらに1時間店差したdh f r 欠機C H O 株に添加し、8時間インキュペートした。PBS で細胞を洗浄し、5mlのMEMa (非選択培放) を加えて16時間培養した。細胞をPBS [NaC4 8s/1, KC4 0.2s/1, NasHPO (編水) 1.15g/f KHsPO Q.2g/ 4] で洗浄し、Q.05%トリプシン、 Q.02%EDTA (エチレンジアミン4酢酸) を含む排液3世を加え、余分の熔液を除いた後、 3 7 七に 5 分間インキュペートした(トリプシ ン処理)。 透析PCS (ギブコ・オリエンタル 社製)を10%、7.5% NaHCO。溶液を 1/50量、 100×非必須アミノ酸溶液を1/100 量、G 4 1 8(ギブコ・オリエンタル社製)を 0.3 m/oiになるように加えたMEM ALP HA培地(りず核酸およびデオキシリポ核酸不 含有) 【以下、この培地をMEMa(選択培地) と略記する〕を加えてよく細胞を緊張し、直径

10cmのディッシュを用い、37℃、CO。イ ンキュペーターにで5日間培養した。PBSで **稲砲を洗浄し、ΜΕΜα (選択培地) を加えて** 5日間培養した。同様の操作をして、さらに5 日間培養した。PBSで解胞を使みした後、ト リプシン処理し、10mlのMEMα(選択培妣) を加えて観眩を撃闘し、直径 Bczのディッシュ を用い、37七、CO+インキュペーターにて 3~7日間培養した。出現してきたコロニーを トリプシン処理した後、50aMのメソトレキセー ト(以下、MTXと略記する)を含む10elのM EMα (選択培地) を用いて細胞濃度 5×10° /■!になるように直径10cmのディッシュⅠ枚に 短え込んだ。5日おきに上記培地を用いて培地 の交換を計3回行った。出現してきたMTX殻 性のコロニーを単コロニー分離し、各々直径 6 csのディッシュを用い、コンフルエントになる まで培養した。その後、PCSを含まないME M & (選択培地) に交換し、2日後、培養液中 のhG-CSF [ND28] の生産量を調べた

ところ、タローン版 2 2 が最も多く、その h G ー C S P (N D 2 8) 生産量は 1 0 ペ/10° 筋 育・2 日であった。この タローンを、1 0 0 mi の 50 nikm T X を含む M E M α (選択 培地)を含むファルコン (Falcon) 3027 型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、P C S を除去した上紀培地を用い、3 日間培養した。この 100 mi の培養液は実施例 5 で用いた。

PASN6を保有する動物額数によるhG-CSP[ND28N6]の生産:

PASN 6 およびdofr 欠損 C H O 審核株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で、h G ー C S P (N D 2 8 N 8) を生産する知助株を得た。この中でクローン版 16の生産量が最も多く、その生産量は 7 ペ/10° 無額・2 日であった。このクローンを、1 D 0 α1の50 α1M T X を含む NBH α (選択格域)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、P C S を験去した上記培地を用い、3 日間格養した。この1 0 0 e1の 要被は実施例

5で用いた。

CO pASN145を保有する動物細胞による hG-CSP[ND28N145]の生産:

PASN145およびdhfr欠損CHO細粒株を用いて、上で述べた手間と同様の手順で、hG-CSF [ND28N145]を生産する細胞株を得た。この中でクローン私9の生産量が最も多く、その生産量は7g/10°細胞・2日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEMα(選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例5で用いた。

(4) PAS3-3を保存する動物細胞によるhG - CSPの生産:

参考例10で得られたpAS3-3および dhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べ た乎取と同様の手取で、hG-CSFを生産す る細胞株を得た。この中でクローン版5の生産

hG-CSPの曹線導入型誘導体、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N 8] およびhG-CSF [ND28N145] のプロナアーゼ抵抗性とhG-CSF [ND28 N8] の独安定性に関する検討

(1) 締結付加の確認

実施例 4 で得た天想型 h G - C S P 、 h G - C S P (N D 2 8) 、 h G - C S P (N D 2 8 N 8) あるいは h G - C S P (N D 2 8 N 145) を含有する無血清特養液から、進心により細胞を完全に除去した後、各サンプル 1 5 減を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(レムリ

(1970)] に供した。この際、プラスミドDNA を含まないCHO細胞の培養上滑と、大腸歯で生産、精製したトG一CSFおよびトG一CSF およびトG一CSF およびトG一CSF およびトG一CSF おりりゅう かって ア (下の) という では、 大阪 (下の) という (下の) にいう (下の) にいう (下の) という (下の) にいう (下の)

(Laconti): *47+- (Hature) 227 .880

天然の h G - C 5 F あるいは C H O 細胞で生産される h G - C 5 F は、N 末端より第133 番目の T h r 機基に O - グリコシド結合型軽切が 1 本付加することが知られている。 またその

とき付加する結婚には、シアル酸を1個合むものと2個合むものの2種があることも知られている〔大枝ら:ジャーナル・オブ・バイオケギストリー (J. Biochen,), 103,544(1988)〕。 本研究においても、同様にCHO細胞で生産したかGーCSPにはOーグリコシド結合型結婚が一本付加していた。また付加する糖類には、シアル酸を1個合むものと2個合むものが存在していた。第8の図または第8の図で見られるかGーCSPの2本のバンドはシアル酸の数の違いによるものである。

これに対してHO級的で生産されたhGーCSP(ND28)には、Oーグリコンド結合型舗 類が1つ付加したものに加え2本付加したもの も存在していることが判別した。また、hGー CSP(ND28)にNーダリコンレーション 結合部位を新たに導入したhGーCSP(ND28N145) では、ともに生産される全hGーCSPの的 1/3 にNーグリコンド結合型領部が付加していた。 その無、hG-CSP(ND28N145)に おいては、hG-CSP[ND28]の場合と 同様に、新たなローグリコシド軸合型種類が付 加されたものも存在していた。したがってhG -CSP[ND28N145] の場合、付加す る結論の種類と数の違いによりも種のポリペプ チャが存在している。すなわち、天然型と同様 に一木のローグリコシド結合型雑績が付加した もののほか、ローグリコシド結合型精錬が2本 付加したもの、ローグリコシド結合型鉄鎖が1 本、Nーグリコシド結合整路線が1本付加した ものおよびローダリコシド結合型籍類が2本、 Nーグリコシド組合型链線が1本付加したもの が存在している。一方、h G - C 5 P 【N D 28 N 6]には、新たなローグリコシド館合型機構 の付加はほとんどない。

なお、Nーダリコシド結合型締約が付加していることは、Nーグリコシド結合型無線とボリベプチャの結合部分を切断する酵素であるNーグリカナーゼ(生化学工業)で処理することに

特開平2-227075 (28)

より破球した。〇一ダリコシド結合型管鎖の場合は、〇一グリカナーゼおよびシアリダーゼ (ともに生化学工業)を用いて確認した。第8 個面は、第8個面の核式回であり、各々のバンドが有する管鎖の種類と数について起してある。 (2) プロテアーゼ医抗性の検針

前項で示したように、CHO細胞で生産した hG-CSP(ND28]、hG-CSP(ND 28N6) およびhG-CSP(ND28N145) には、各々新たな情報が付加したものと付加し ないものが存在していた。そこで新たな精緻が 付加したものと付加しないものを両方含んでい る前項の場象上待に直接キモトリプシンを加え ることにより、結鎖の付加の有無によるプロテ アーゼ抵抗性を比較した。hG-CSP(ND 28)、hG-CSF(ND28N8)および hG-CSF(ND28N8)および hG-CSF(ND28N145)を各々含有 する前項の培養上待450mtに0.5mg/m1のキ モトリプシン(シグマ(Signa)社製)を各々2 mm 元、37でで保温した。キモトリプシンを 添加後10.20.30.80.120.180
分後に60点ずつ採取し、SDSーポリアクリルアミドゲル電気飲助用の提衝液〔0.25 M
TrisーHCL(pH6.8)、8%ラウリル
硫酸ナトリウム(SDS)、40%グリセロール、0.004%プロムフェノールブルー)を
20点添加することにより反応を停止させた。
またキモトリプシンを添加しないサンブルも顕
製し、これをキモトリプシン添加後0分の試料とした。

次に各は料20以をSDSーポリアクリルア
ミドゲル電気状動に供し、その後ニトロセルロース膜にポリペプチドを移した後、前項と同様にして酵素状体染色を行った。その結果、hGーCSF(ND28)、hGーCSF(ND28N6)、hGーCSP(ND28N145)のいずれの場合においても、新たな精緻の付加したものは添加しないものに比べてキモトリプシン抵抗性になっていることが利明した。

hG-CSF [ND28] においてはローグ

リコシド結合型蓄線が『本付加じているもの』 (天然型) よりは 2 木付加しているものの方が キモトリプシン抵抗性になっていた(第840回)。 またbG-CSF(ND28N8]の場合、N ーグリコシド結合重糖値が新たに付加したもの の方が付加していないものより抵抗性になって いた (第8句页)。 h G-C S.P (ND 2.8 N 1 4 5] の場合は、ローグリゴシド結合型機械 を1本もつもの(天悠景)と、ローグリコシド 結合型器級が新たに1本付加したもの、Nーダ リコシド結合型管線が新たに付加したもの、お よび両方が新たに付加したものの4種のポリベ プテドが存在しているが、この場合もNーグリ コシド結合型額線が新たに付加したものの方が **狂抗性になっていた。また、Nーグリコシド島** 合型複数に加えCーダリコシド給合型を級が新 たに付加したものではさらに抵抗性になってい た〔第8回寅〕。

🖾 熱安定性に関する検討

実施例400で た、hG-CSF(ND28

N 6] を含有する無血清培養液 5 mlをモルカッ トー10(ミリボア社製)を用いて500㎡に 義確した。次に、そのうちの100㎡をSuperose 1 2 カラム(ファルマシア社製)(Ica× 3 0 ca)に選塔し、Nーグリコシド結合豆舗鎖の付 加したhG-CSF [ND28N8] のみを分 取した。クロマトグラフィーには、0.1 M Tris-HC4(pH8.0), 0.2M NaC4, lmM EDTAを合む級衝波を使用した。透 塔は0.5ml/ein で行った。上記クロマトグラ フィーを3回線り返し、Nーグリコシド結合型 雑組の付加したヒトG-CSF [N.D.2.8 N.6.] を含む溶液(ヒトG-CSP濃度は約1.7 m/ml) を約1.5ml得た。この溶液350点に、1%ツ ィーン (Twees) 2:0 を3.5 雌とNーグリカナー ゼ (生化学工業社製) モ1 ㎡ (0.25 Units)加 え、37セで17.5時間反応を行い、Nーグリ コシド箱合型器線の除去を行った。また、N-グリカナーゼのかわりに波貫水を1月加えたも のも同時に何襲し、同様に反応に供した。反応

持開平 2-227075 (29)

等了後両反応被の一部そSDS-#9アクリル アミド電気水動に供し、その後無染色を行うこ とにより、N-グリカナーゼ処理したサンプル においては、N-グリコシド結合型結婚が除去 されていることを確認した。

上記の両反応被は、反応終了後直ちに58℃での無安定性の比較の実験に使用した。各反応被80減を58℃に保温し、0.30.120.240.360分後に10減ずつサンプタングを行い、マウスの骨盤造血幹細胞を用いたコロニー形成機試験により100℃を50回に示す。回中の活性とした。その結果を第87回に示す。回中の活性を100%とした時の複が活性で示してある。なお、37℃で17.5時間保温した後の活性を100%としたとき、Nーグリカナーでは86.8%であった。

第8の図に示したように、N + グリコシド結 合型精組の付加した h G - C S P 【N D 2 8 N

酵素PstlとBsmHIとをそれぞれ10単位ずつ加え、37℃で2時間消化反応を行った。 65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い て約7.2 KbのDNA断片を特製した。

このようにして得られたpUK1由来の 890 bpのDNA断片とM13mp18RP由来の的 7.2 KbのDNA断片を全量20mのT4リが一 せ級衝接に溶かし、300単位のT4DNAリ が一せを加え、4でで18時間結合反応を行っ た。

次に、公知の方法 [メシング (Hessing) ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Bezyeology) 101 . 20(1983)] に従い、上記 反応被を用いて大器選 J M 1 0 5 株をトランス フェタションし、紅挽え体ファージを得た。狭 いて、公知の方法 [上記文献] に従い、この組 換え体ファージを大器選 J M 1 0 5 株に越築さ せた後、埼美波から 1 本類ファージ D N A を回 収した。また、培美選 より、プラス 1 Y D N A 回収法に じて、 2 本類ファージ D N A を回 6] (コントロール) は両着線を輸去した b G - C S P (N D 2 8 N 6) (N ーグリカナーゼ 処理)よりも然に対して安定であることが利明した。

実施例 6.

UK-S1発現プラス : ドゥSE1UKS1-1dの治皮:

(1) 荷型1本額DNA (1本箱pUKmpS1)の治成:

参考例2で得た約3 mのpUK1を30 mの Y-100級街旅におかし、制限酵素Pst[とBamHIをそれぞれ10単位ずつ加え、 37でで2時間消化反応を行った。85で、 10分間の熱処理後、APT法[ベイオテクニ クス(BioTachaiques)2 .66-67(1984)]を用いて890bpのPstI-BamHI DNA 断片を搭載した。

一方、M13ファージベクターであるM13 mp18RP DNA (空酒遊社製) 約1 jgを 全量30 gtのY-100 観節液に溶かし、制限

収した。この2本級ファージDNA(pUKmpS1)の構造は制限酵素消化により確認した(第9回参照)。

図 オリゴヌクレオチドを用いたUK・cDN Aへの変異の導入:

(A)・変異導入用合成DNAの顕製とリン酸化: UKの184番目のアミノ酸残基Pboを Asnに変え、物類を付加したUK誘導体(このUK誘導体を以下、UK-S1と時記する) を製造するため、17塩基の合成DNA 5′-6666AGAAAACACCACC -3′をアプライド・パイオシステムズ社380A,DNA合成機を用いて合成した。

次にこのようにして得られた合成 DNA 25 ピコキル (paoles) を10 Mの50 mM TriaーHCL (pH7.6)、10 mM MsCL。、5 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.5 mk ATPを含む溶液中で、5単位のT4 DNA キナーゼ (空通過社製) を加え、37 でで30分間反応させることにより、57 束衛モリン酸化し

£-

(B) 2種のオリゴスクレオチド・プライマー を用いる部位特異的変異の導入:

上で得られた1本舗の観技えファージDNA 6.5 m (約2mのDNAを含む) と1mの10 倍濃度のポリメラーゼ級衝散 (500mM Tris-HC4 (pH7.8), 70 mM MgCL BOMM 2ーメルカプトエタノ - - N. O. 2 5 mM d ATP. O. 2 5 mM dCTP、0.25mM dGTPst0.25 mM dTTPを含む〕と上記で再られた変異 導入用合成DNA2雌(2.5 ピコモル)を混合 した溶液を65でに5分間、55でに5分間、 37でに10分間、25でに10分間放産した 後、3単位の大路離DNAポリメラーゼ1・ク レノー (Klenow) 斯片 (宝額遊社製)(以下、ク レノー斯片と略記する) を加え、25℃で30 分間反応させた。次いで、この反応液に、1㎡ の10倍減度のポリメラーゼ級衝波と0.5 paole/雌のMI3プライマーM4(宝酒造社

法を用いて約1.0 kbのAatII — Pst I 斯片を情報した。別に参考例1.2 で得られたp U K Bi 0.1 プラスミドDNA約3 Mを3.0 MのY — 5.0 機衝液に移かし、1.0 単位のAatIC 1.0 単位のEccRIを加え、3.7 でで2時間消化反応を行った。6.5 で、1.0 分間の無処理後、APT法を用い、約2.9 kbのAatII — EcoRI 版片を精製した。

このようにして得られたpUK11由来のAatI-PstI断片(約0.05 kg)とpUKB101由来のAatI-EcoRI断片(約0.1 kg)と変異を導入した約600 bpのPstI-EcoRI断片とを20 kgのT45 ガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

得られた単独之体プラスミドの混合物を用いて、大腸値C 6 0 0 S P 8 株(プロシーディング・オブ・ブ・ナショナル・アカデミイ・オブ・サイエンス(Proc, Nati, Acad, Sci.)USA 72,

製)6点と3単位のクレノー断片を加え、37 でで10分配、25でで40分配反応させた後、 10m以 ATPを2点と300単位のT4D NAリガーゼを加え、11でで18時間結合反応を行った。この反応被に対して、フェノール 抽出とクロロホルム抽出を行った後、エタノー ル沈麗によってDNA断片を回収した。このD NA断片を全量30点のY-100級衝散に溶かし、12単位のEcoRIと12単位のPst 「を加え、37でで2時間消化反応を行った。 55で、10分間の約処理後、AFT法を用いて約800bpのPstI-EcoRI断片を精 製した。

(C) 変異を導入したDNA断片のペタターへ の組み込み

参考例3で得られたpUKI1プラスミドDNA的3点を30点のY-50級衝波に溶かし、10単位のAatI(實際紡績社製)と8単位のPstlを加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、APT

3418(1975)] を形質伝換し、Ap耐性株を得た。この形質伝換株からコロニーハイブリダイゼーション決を用いて、変異導入用合成DNA(上述)の5"末幅を**Pで放射機構造したプローブとハイブリダイズする組換えブラスミドpUKS1を単雄した。制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いだディデオキシ・シークエンス法により、pUKS1が目的の構造を有することを破越した(第10図参照)。

(2) UKーS1発現プラスミドpSE1UKS1-1dの遊成:

参考例 9 で各られたpSBIPAISEIdhfri-9A ブラスミアDNA的 2 成を3 0 成のY-0 級衝液に排かし、1 0 単位のKpnIを加え、3 7 でで2時間消化反応を行った。続いて1.5 成の2 M NaC & と1 0 単位のXho I を加え、3 らに3 7 でで1時間消化反応を行った。6 5 で、1 0 分間の熱処理後、APT法を用いて約8.6 KbのDNA新片を特製した。また、pSEIUK prol-1A プラスミアDNA約3 成を3 0 成のY

一100級価値に移かし、12単位の日81日 と12単位のXbolを加え、37セで2時間 消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理 後、AFT法を用いて約0.75kbのDNA断片 を情襲した。一方、上で得られたりUKS1プ ラスミVDNA約3減を30減のY一0級衝痕 に移かし、15単位のKpnIを加え、37セ で2時間消化反応を行った。続いて1.5減の2 M NaC&と12単位のBg&日を加え、さ らに37セで1時間消化反応を行った。 65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い で約1.15kbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSEIPAISEIdhfrl-9A 由来の約8.8 KbのDNA断片(約0.1 m)、 pSEIUKprol-1A 由来の約0.7 5 KbのDNA断片 (約0.0 2 m)、およびpUKS1由来の約 1.1 5 KbのDNA断片(約0.0 2 m) を全量 20 mのT4 リガーゼ級衝液に移かし、100 単位のT4 DNAリガーゼを加え、4 tで18 時間結合反応を行った。

社製) 1/50量を加えたM E M α (非選択培地) 5 mlに 1 x 1 0 *細胞/alになるように細胞を * 接続し【培養には直径 6 cmのディッシュを使用 した: LUX社製(以下、培養にはLUX社の ディックュを用いた)】、37℃、CO・イン キュペーターにて1日間培養した。一方、pSi EIUKSI-1d DNA 10me450 #010mM Tris-HC# (pH7.5) NaC4, 1.5 mM Na HPO . 50 mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラ ジンーN′ー2ーエタンスルフォン酸)(pH 7.1)を含む体液を加えて混合した。さらに50 MO25M CaCI。移放を加えて混合し、 室温で5分間鬱鬱した。このDNA熔液全量を、 培的を致き新しいMEMa (非選択培助) 10 alを加えてさら1時間培養したdhfF欠損 CHO株に添加し、8時間インキュペートした。 PBSで細胞を洗浄し、5 mlのM E M α (非選 祝坊坊)を加えて18時間培養した。細胞を

得られた鉱族之体プラスミドの混合物を用いて、大器館MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換 からプラスミドDNA、pSE1UKS1-1dを単載し、制限課業補化による構造解析を行ったところ、pSEIUKS1-1dは目的の構造を有することを確認した(第11団参照)。

プラスミドpSE1UKS1-1dを含む数 生物は Escherichia coli BUXS1-1d FERN BP-2072として昭和63年9月24日付で数工研に 毎託してある。

实施例7.

U K - S 1 および p τ σ - U K ポリベプチド の動物細胞による生産:

(I) pSE1UKS1-1dを保有するCHO 細胞によるUK-S1ポリペプチドの生産:

実施例 6 で得られた p S E 1 U K S 1 - 1 d
のd'h f r 欠価 C H O 株への導入はリン酸カル
シウム法に率じて行った。すなわち、F C S 1/10
量および7.5%N a H C O z 溶液 (Flow Laboratories

PBS (NaC1 8g/1, KC1 0.2g/1, Na.HPO。(無水) L.15g/1、KH.PO. 0.2g/1) で洗浄し、0.05%トリプシン、 Q.2%EDTA (エチレンジアミン四酢酸) モ 含む溶液 3 mlを加え、余分の溶液を除いた後、 37七に5分間インキュペートした(トリプシ ン処理)。 遺析FCS(ギブコ・オリエンタル 社製) を10%、7.5%NaHCO, 格故を 1/50量、100×非必須アミノ機溶液を1/100 量、G418(ギブコ・オリエンタル社製)を Q.3 mg/mlになるように加えたMEMa(選択 格域)を加えてよく制的を脳周し、直径10cm のディッシュを用い、37℃、CO。インキュ ーペーターにで5日間培養した。PBSで細胞 を使浄し、MEMα(選択培地)を加えて5日 間培養した。同様の操作をして、さらに5日間 格表した。PBSで雑胞を洗浄した後、トリブ シン処理し、10elのMEMα(選択培地)を 加えて銀数を整備し、直径 6 ㎝ のディッシュを 用い、31℃、COパンキュペーターにて3.

~?日間培養した。出現してきたコロニーをト リプシン処理した後、50nMのMTXを含む 1 CalのMEMa (選択培諭) を用いて部数量 度5×10*/alになるように直径10caのデ ィッシュ1枚に値え込んだ。5日おきに上紀塔 地を用いて特地の交換を計3回行った。出現し てきたMTX耐性のコロニーを単コロニー分館 . し、各々直径8mのデイッシュを用い、コンフ ルエントになるまで終巻した。 5 mlの 5 fl n M MTXを含むMEMα(選択培地)に交換し、 1日後培養液中のUK-S1の活性をフィブリ ン・プレート、アッセイ注 [Granelli-Piperno とReich: ジャーナル・オブ・エグスペリメン タル・メディシン(J. Exp. Ned.) 148, 233(1978)] を用いて調べた。その結果、タローン版12の括 性が最も高く、そのUK-S1の生産量は5点 /10⁶細胞・日であった。このタローンを100ml の50nM MTXを含むMEMα(選択培放) を含むファルコン (Palcon) 3027型ローラー・ ポトルで培養し、コンフルエントになった後、

PCSを設立した1°0 XIU(m1アプロチニン(ペータンガー・マンハイム社)を含む上配培強を用い、3日間培養した。この100m1の培養核は実施例8で用いた。

② pSE1UKprc1-1Aを保有する動物類数によるpro-UKポリペプチドの生産:

参考例13で得られた組換え体プラスミド
pSE1UKprol-1AとpSV2-dhfr
およびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上
で述べた手順と同様の手順でpro-UKを生
置する細胞株を得た。この中でクローン版5の
送性が最も高く、そのpro-UKの生産量は
3 M/10 M M であった。このクローン
を、100miの50nM M T Xを含むMEM
の(選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで搭載し、コンフルエントになった後、FCSを験去した10ki0/mirプロテニン(ペーリンガー・マンハイム社)を含む
上記培域を用い、3日間培養した。この100
miの培養液は実施例8で用いた。

实施例 8. -

天然型 p r o - U K と糖納付加型修飾 U K - S 1 の トロンピンに対する感受性の比較:
 (1) p r o - U K と U K - S 1 の C H O 細胞培養液からの精製:

実施例?で存た天然型のproーUKあるいは簡級付加型修飾UK-S1を含有する無血液 培養液でれぞれ100mlに対して0.05%フィーン (Tween)80と0.05%NaNaを含む 50mM 9ン酸硬価板 (pH 7.5) (以下PBS ーTAと鳴す)で平衡化した5mlのジンク (Zn) ー中レートーセファロース (Sopharoso) (ファ ルマシア・ジャパン株式会社 (Pharmacia Fing. Chemicals)製〕を添加し、4でで1時間以上継 やかに混合した。この混合液をペイオラッド (Bio Rad)社製のエコノカラムにつめた。

各カラムを10ペッド体徴の10KIO/aiアプロチニンを含むPBS-TAで表許した後、
10KIO/aiアプロチニンと50mMイマダゾール (imidazole)を含むPBS-TAで採出を行

った。この格出面分について上述のフィブリン・プレート・アッセイ技によりクロキナーゼ蛋白質の有無を編べ、クロキナーゼ蛋白質を含む 図分を集めた。この溶液に対して、PBSーT Aで平衡化した5mlのSPーセファデッタス (Sephadex) C50 [ファルマシア・ジャパン株式会社(Pharmacia Fise Chemicals)製] を添加し、4でで1時間以上種中かに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セパコール・ミニ) に充填した。カラムを10ペッド体験のPBSーTAで洗浄した後、3ペッド体験の500mM NaCAを含むPBSーTAで排出した。

次に、直ちにこの参出液に対して、PBSーTAで平衡化した1elのペンデミジン(Benzaeidine)ーセファロース (Sepkarose) BB (ファルマシア・ジャパン株式会社製) を添加し、4 でで1時間以上、弾中かに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セパコールミニ)につめ、非通り函分を集めた。この無通り函分

には、1 本舗の天然型 p r o ー U K あるいは 1 本舗の U K ー S 1 が含まれていた。

UKーS1に新たなNーグリコンド結合型結 線が付加していることは、SDSーポリアクリ ルアミドゲル電気状動を用いて天然型proー UKとUKーS1を解析したときに、UKーS 1の方が天然型proーUKよりも分子量が大 きいこと、および天然気proーUKとUKー S1をNーダリカナーゼで処理することにより、 両者の分子量が減少しほぼ同一になることによ り確認した。

② 特製した天然型pro-UKおよびUK-S1のトロンピン感受性テスト:

上で得られた天然型pro-UKおよびUK
-S1を含む溶液をフィブリン・プレート・ア
y セイ技を用いてクロキナーゼ活性として1000
IU/elとなるように300mM NaC & を含むPBS-TAで意訳した。この希釈液216
成に24μMヒト・トロンピンを36 成添加し、
37でに保温した。ヒト・トロンピンはシグマ

12図参照)。この結果はUK-S1の方がトロンピンに対する感受性が低いことを示す。

さらに、この結果を確認するため、S-2444 アミドリティック(amidolytic)活性の例定を 行った。すなわち、上足の試料をTNT硬価液 【0.5 M Tris-HCl(pH7.4)、 0.38 M NaCl(0.1% Tween80] で5倍希釈したもの50mkに、10mMヒト・ プラスミン (Plasmin)を50m加え、37でで 30分間反応させた。ヒト・プラスミンはベーリンガー・マンハイム社製のものを用いた。次 に、発色性基質S-2444【1.2 mM;カピ (Kabi Vitrum) 社製】を50m添加し、さら に37でで90分間反応させた後、405 nm の吸光皮を概定し、アミドリティッタ活性を算 出した。その結果を第13間に示す。

第13旬に示したように、UKーS1は天然型proーUKに比べ、トロンピンに対する感受性が低いことが判明した。

(Signa) 社談のものを用いた。また、ヒト・トロンピンは2981Uのトロンピンに対して
1001Uのアプロチニンを加え、37でで一時間反応させた機品を用いた。トロンピンを添加した後、15.30.60.120分後に63㎡プロサンプリングし、24μMのトロンピン阻害剤(Thromatop・American Diagnostica社会)を9点加え、反応を停止させた。また、トロンピン添加後、直ちにトロンピン阻害剤を加えたサンプルも興製した(これをトロンピン添加後0分のサンプルとした)。また、対照群としてトロンピンを添加していないものを37で便温した。

次に、各試料 2 2.5 成をS D S ーポリアクリルアミドゲル電気状動 [レムリ (Laecali): ネイイチャー (Nature) 227,680(1970)] に供することにより、1 本娘のウロキナーゼ (誘導体)が2 本額になったかどうかほべた。 その結果、天然型 p r o ー U K に比べて U K ー S 1 の方が2 本額になる割合が少ないことが判明した (第

实施例9.

天然型pro-UKと結集付加型体的UK-S1の<u>in vivo</u> 評価:

(1) 持続柱入 (Infusion) による実験:

生後4~6ヶ月の建ビャグル犬(体重5.5~ 11.5年) を用いた。39年/20ペントパル ピタールナトリウムの静脈内投与により麻酔し、 室内空気による人工呼吸を施した。実施何8-ODの方法で得た天然型pro-UKおよび結婚 付加型修飾UK一S1を大路停服より30分間 (20000/14/分) 持続往入し、投与前 (0分)、投与開始後15、30、45、60、 9 0分の各時点において大陸動脈より提血した。 採血した血液は直ちに進心分離して血漿を得、 概定までー20℃で凍結保存した。得られた血 費を用い、実施例9.一切に使い 全身線体系因 子の側定を行った。その結果、籍鎖付加塑佐飾 UK-S1は天然型pro-UKと同様にほと んど全身被容系因子を活性化しないことがわか った(第45回 照)。また、ウロキナーゼに

対する抗体を用いたサンドイッチ型の破壊免疫 測定法により、天然型pro-UKおよび機動 付加型修飾UK-S1の血漿中濃度の稠定を行ったところ、天然型pro-UKの血漿中から の角矢半減期が12.0分であったのに対し、緩 傾付加型修飾UK-S1では24.2分であり、 消失平減期の延長が認められた。また、このと きの血漿中濃度一時間由線下面積 (AUC) については緩線付加型修飾UK-S1のAUC は天然型pro-UKのAUCの約3.6倍であった〔第8表-(A)参照〕。

② 急速静柱 (bolus)投与による実験:

超雄の雄母犬(体質4.6~13.0 kg)を用いた。上と同様にして準備した犬の大腿動脈を約5cmにわたって露出し、その最も中枢に近い所に電磁血液計を装着した。分岐を含む動脈の一部(約1cm)の前後を結集して血液のない小部分を作り、分岐から1000ビノョのトロンピン(ミドリナ字)を0.2~0.4 w往入してこの部分に血栓を作製した。血栓生成の有紙は血液

類付加型体的UK-S1では48.1分であり、 前失半減期の低長が認められた。さらにこのと きのAUCは天然型pro-UKの約5.6倍で あった〔第8表- (B) 参照】。

(3) 全身機溶系因子への影響の検討:

全身被将系因子として、α2ープラスミン インヒビター、プラスミノーゲン、フィブリノ ーゲンの3項目について固定を行った。

Tべての項目の被検血数は、全血液 9 容に
3.8% タエン酸 1 容を加えたものを 3 0 0 0 回
転/分で 1 0 分間遠心した上摘として得た。これに加えて、 α 2 ープラスミン インヒビター、
プラスミノーゲン制定用血漿には最終温度 12.5
μ M の P P A C K (0-phenyl alanyl-L-prolyl
-L-arginine chloromethyl ketone、CALBIOCHBN®、
Lot \$586042。 Hoechst) を、またフィブリノーゲン制定用血漿には 2 5 0 U / m の アプロチニン
(トラジロール®、パイエル)を添加した。

選定はオリンパス社製、オートアナライデー AU510を用いた。は要はα2ープラスミン 量の増減によって判断した。血栓生成後、最低1時間(1~1.5時間)放展し、自然溶解が起こらないことを確認した。天然型proーUKおよび複線付加型保険UKーS1(0.6 m/kg)は3分間の急遽争往とし、投与前(0分)、投与開始後15、30、45、60、90、120分の各時点において提血した。

その結果、天然型pro-UKでは個べた2 例について血栓の再発速が認められなかったの に対し、結構付加型体飾UK-S1を投与した 犬3例全でに再阻透が認められた。このときの 全身報格系因子の測定を行ったところ、天然型 pro-UKでは全身破解系因子の活性化傾向 が見られたのに対し、循鎖付加型体飾UK-S 1では、infusionの場合と同様に全身確容系因 子の活性化は認められなかった(第46回参照)。

また同時に、天然型pro-UKおよび結婚 付加型修飾UK-Slの血漿中濃度の測定を行ったところ、天然型pro-UKの血漿中から の消失半減期が30.3分であったのに対し、額

インヒピター、プラスミノーゲンの定量には三 共のALPオートカラー三共をそれぞれ用い、 フィブリノーゲンの定量には国際試実のフィブ リノーゲン試裏を用いた。

饭 8 麦

天然型 p r o ー U K および領域付加型佐飾 U K ー S I の血中半線期

(A) 持続性入(ビーグル犬)

	T1/2(min)	AUC (pg - min/mt)
pro-UK	12. 0 ± 1. 9	60. 2 ± 13. 4
U K - S 1	24. 2 ± 10. 0	214 ± 57, 6

(B) 急速停住(鎖犬)

	T1/2(min)	AUC (ag · min/m²)
рго-ИК	30.3±8.9	98.8±38.1
U K - 5 1	48.1±2.0	555° ± [18

实施例 1 C.

糖銀付加型修飾UKーS3をコードする組換 えプラスミドpUKS3の遊成:

特開手 2-227075 (35)

実施何6の〇一(C)で得られたりUKS1プラスミドDNA約2減を30点のY-100級数次に称かし、16単位のC「r「と10単位のHind回を加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約0.75 KbのDNA斯片を搭製した。一方、参考例20で得られたりhPA2プラスミドDNA約2減を30減のY-100級衝滅に排かし、10単位のHind回と1単位のEcoR」を加え、37でで2時間消化反応を行った。85で、10分間の熱処理後、ATP法を用いて約3.4 KbのDNA断片を特製した。下記2機の合成DNA(43塩基と43塩素)を実施例1に述べた方法に従い、合成および5、末端のリン酸化を行った。

5'-GGC CAA AAG ACT ATT CGA ACG CGT TTT AAG ATT ATT GGG GGA G- 3'
3'- IT TTC TGA TAA GCT TGC GCA AAA TTC TAA TAA CCC CCT CTT AA-5'
このようにして得られたpUKS1由来の約
0.75 KbのDNA断片(約0.1 mg)、phPA
2由来の約3.4 KbのDNA断片(約0.1 mg)、

2時期前化反応を行った。彼いて1.5mの2M NaClel D.単位のXholを加え、さらに 37 でで1時間消化反応を行った。85 ℃、10 分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.8 Khの DNA断片を情襲した。また、pSE1UK prolーlAプラスミドDNA的3点を3 a ■のY-100級衝波に体かし、12単位の・ Bellと12単位のXholを加え、37℃ で2時間消化反応を行った。65℃、10分間 の熱処理後、APT技を用いて約0.75 Kbの DNA衛庁を精製した。一方、上で得られた pUKS3プラスミドDNA約3個を30層の Y-0級衝波に炒かし、15単位のKpnIを 加え、37℃で2時間抗化反応を行った。続い T1.5mの2M NaC&と12単位のBg& □を加え、さらに37℃で1時間剤化反応を行 った。 65℃、10分間の熱処理後、AFT佐 を用いて的 L. 1 5 Kbの D N A 断片を精製した。 このようにして得られたpSEIPAISEIdhfr1-9A由 来の約8.6 KbのDNA断片(約0.1 M)、

および5・リン酸化された2種の合成DNA(1 ピコモルずつ)を全量20回のT4リガーゼ級 断波に体かし、300単位のT4リガーゼを加 え、4でで18時間結合反応を行った。符られ た紙換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸 個MM294株を起質伝授し、Ap耐性 そ将 た。この是質伝授株からプラスミドDNAを単 越し、制限酵業消化による複造解析およびM13 ディデオキシ・シークエンス法による塩基配列 決定を行い、目的の構造を育し、Leu153 一Asn、Pro155一Thrの塩基面接を 持つプラスミドDNAをpUKS3と命名した (第47回参照)。本発明で得られたUK-S 3のアミノ酸配列を第7表に示す。

実施例 1 1.

UK-S3発現プラスミドpSEUKS3の 造成:

参考例 9 で得られたpSE1PAISE1dhfrI-9AプラスミドDNA的 2 点を3 0 点のY-0 最衝液に 拾かし、1 0 単位のKpn I を加え、3 7 でで

pSE1UKprol-1A由来の約0.75KbのDNA断片(約0.02 m)、およびpUKS3由来の約1.15KbのDNA断片(約0.02 m)を全量20mのT4リガーゼ級衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

各られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap射性株を得た。この形質転換体からプラスミドDNA、pSEUKS3を単離し、制限酵素剤化による構造解析を行ったところ、pSEUS3は目的の構造を有することを確認した(第48図参照)。

プラスミドゥSEUKS3を含む大猫面菌株はEscherichia coli BSEUKS3 (PERM BP-2478) として1989年8月15日付で微工研にプダベスト集的のもとに参托してある。 実施例12

pSEUKS3を保有する動物細胞による UK-S3ポリペプチドの生産: 実施例11で得られた組換え体プラスミドゥSEUKS3およびdhfr欠価CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順でUK-S3を生産する細胞株を得た。この中でタローン13の活性が最も高く、そのUK-S3の生産量は3両/10°細胞・日であった。このクローンを、100㎡の50nM MTXを含むMEMの(選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを設安した10 KUJコアプロテニン(ペーリンガー・マンハイム社)を含む上記塔地を用い、3日間培養した。この100㎡の培養被は実施例13で用いた。

実施併13.

精銀付加型修飾UK-S3の無安定性に対する絶対:

実施例8〜(1)と同様にしてCHO細胞培養液から観線付加型修飾UK〜S3を精製した。精製された天然型pro-UKおよび镀線付加型

個無以 K - S 3 を 5 0 m M リン酸、 2 0 0 m M アルギニン、 1 0 0 m M Na C & 、 0.01% Two e n 8 0、 0.05% アジ化ナトリウムから成る硬管板(p H 7.5)に 1 0 成/世になるように体解し、 7 0 ででインキュペートした。インキュペート開始後、 1、 2、 3、 4 時間目にサンプリングを行い、水中で冷却後直ちにフィブリン・プレート・アッセイを行い、独存活性を測定した(第 4 9 回参照)。

糖類付加型修飾UK-S3は天然型pro-UKよりも熱に対して安定であることが明らか となった。

参考例1.

ヒトt-PAcDNAを選ぶプラスミ V ptPA7 の造成:

(I) Detroit562額数よりのポリ(A) RNAの副製: ヒト階級ガン細胞株Detroit562より、テオシ アン酸グアニジン一塩化リチウム法 (カサラ (Cathale) ら:ディーエヌエイ (DNA) 2, 329(1983)] に従い、ポリ(A) を有するRNA を下記のごとく類無した。

ヒト電銀ガンDetroit562 (ピーターソン・ダブリュ・ディ・ジュニア (Peterson、W. D., Jr.) ら:プロシーディングス・オブ・ガ・ソサイア ナィ・フェア・エクスペリメンタル・ペイオロジー・アンド・メディシン (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.) 136. 1187 (1971)] を、10%仔牛給見血清、100×字必須アミノ酸溶液 (Plow Laboratories 社製) を1/100 量、1mHビルビン酸ナトリウム、0.1%ラタトアルブミン水化物 (ギブコ・オリエンタル) を含む50mHのMEM培地 (日水製製

コ(コーニング社製、150 dl)内で生育させた。 37℃でコンフルエント(confluent) になるまで 培養した後、細胞をPBSで洗浄し、 100ng/ elのフオルボール・ミリステート・アセテート (PMA: Phorbal syristate acetate) を活加 し、仔牛胎兒血清を除いた上記培地30mlを加え、 さらに37℃で24時間培養した。続いて細胞を0.05 %トリプシン、0.02%EDTAを含む熔放10 elで処理し、細胞熱療液を取得した。 6 木の上 記ティッシュ・カルチャー・ブラスコから扱針 1×10°の細胞を取得した。細胞部濁液から、 1.100 × s 、 4 ℃、10分間の途心によって細胞 を集め、80mlのリン酸塩パッファーで逆許した 後、5 Mチオシアン酸グアニジン、10ml EDTA 、 50mM Tris-HC & (pRT)および8%(V/V) 2ーメ ルカプトエタノールからなる体液10ml中でポル ナックス・ミキサーを用い可能化した。この可 体化物を進心管に夢し、4M LiC18核80 alを加えて提押した後、4 ℃ 20時間非常した。 Hitachi RPRIDローターにて9,000rpm. 90分

胡油心後、RNAを沈澱として四収した。RNA の辻最を4M求業および2M塩化りテウムから なる書波50mlに感染し、Hitachi RPR10 ロータ ーにて9,000rpm, 60分間造心後、再びRNAを 沈景として四収した。RNAの沈穀をC.1%ラ 、 カリル研費ナトリウム、last EDTA、10sk Tris-HC1 (pH7.5) からなる熔液10mlに溶解し、 フェノールータロロホルムで抽出後、エタノー ' ル光量により回収した。得られたRNA的25 mgを10mM Tris-HC4 (pH8, 0) および1 mM BOTA からなる溶液 l mlに溶かした。65で、5分間イ ンキュペートし、0.1mlの5M NaClを加 えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・カラム 【ピー・エル・パイオケミカル (P-L Biochemical) 社製) タロマトグラフィー (カラム体膜 G. 5 ml). にかけた。吸着したポリ(A)を有するaRHAを 10mW Tris-HC & (pH7.5) および1 mM EDTA から なる溶液で溶出し、ポリ(A)を有するmRNA的 9 0 成を得た。

② cDNA合成とはDNAのペクターへの挿入:

頭となるよう加えた溶液 200歳に加え、さらに 81単位のターミナルデオキシスタレオチジルト ランスフェラーゼ (以下ですてと惑記する) (P-L Biochemicals 社製) を加えて、37で、11 分類反応させた。ここで、pCDV1のKpaI 切断部位の3'末端にポリ(dT)粒が約67個付加さ れた。彼弟故からフェノールータロロホルム拍 出、エタノール沈穀により、ポリ(dT)娘の付加 したpCOVIONA的 100点を回収した。彼DNAモ 10mM Tris-HC# (pH7.5) . 6mM MgC# . . 100mM NaClからなる程を液 150世に加え、さらに 360 単位のEcoRIを加え、37℃ 2.時間反応さ せた。彼反応接をLGT法で処理後、約3.1kb のDNA断片を回収し、約60歳のポリ (dT) 銀付加 pCBV1を得た。 放DNAを10m以 Tris-HC& (pR8,0) およびlaM EDTAからなる溶液 500㎡に 体解し、85で5分間インキュペート後、水冷し て50mtのSN NaCAを加えた。混合物をオリゴ (dA)セルロースカラム (コラボレイティブリサ ーチ社員)クロマトグラフィーにかけた。ポリ

オカヤマーパーグ(Okayana-Bofs)の方法 【モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロ ジィ (Not. Cell. Biol.)、2, 181(1982)】 に従い、c DNAの合成とそれを組み込んだ組 技之体プラスミドの造成を行った。その工程の 医院を第14回に示す。

pCDV1 (オカヤマ・アンド・パーグ
(Okayana & Berg): モレキュラー・アンド・セ
ルラー・パイオロジィ(Mol. Coll. Biol.)、3。
280(1983)] 400 概を10mM Tris-HCL (pH7.5)、6 mK MgCL。および10mM NaCLからなる溶液300 減に加え、さらに500単位の Kpn I を加えて、37で、6時間反応させ、プラスミド中のKpn I 極位で切断した。フェノールータロロホルム抽出後、エタノール洗剤によりDNAを回収した。Kpn I 切断した成DNA約200減を40mMカコジル酸ナトリウム、30mM Tris-HCL (pH6.8)、I mM CaCL。および0.1 mMグチオスレイトール(以下DTTと略記する)からなる級衝液(以下TdT級衝液と略記する)にdTTPを0.25

(dT) 額長が充分なものはカラムに吸着し、これを10mX Tris-HC & (pH8,0) および1mX BDTAからなる溶液で溶出し、ポリ (dT) 鎖の付加したpCDV1 (以下ペクタープライマーと略記する) 27mを得た。

次にリンカーDNAの腐製を行った。
pL1 [オカヤマ・アンド・バーダ(Okayana a Bers):モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジィ(Not. Coll. Biol.)、3, 280(1983)]

助14点を10mM Tris-HCL (pH7.5)、6mM MgCL a および50mM NaCLからなる低衝液 200点に加え、さらに50単位のPatlを加え、37で4時間反応させ、pL10MA中のPatl部位で切断させた。
該反応物をフェノールータロロネルム抽出後、エタノール状況を行い、Patlで切断した
pL1 DNA約13点を回収した。該DNA約13点をTdT低衝波に終濃度0.25mMのdGTPを含む溶液50点に加え、さらにTdT(P-L Bio-chemicalle社製) 54単位を加えて37で13分間インキュペートし、pL1のPatl切断部位37末

間に(d6)銀を約14個付加した。フェノールークロロネルム抽出後エタノール沈澱にてDNAを回収した。該DNA10ml Tris-HC 1 (pH7.5)、6ml Mg C1。および60ml Na C1からなる観衝液 100mに加え、さらに80単位のHind回を加えて37で3時間インキュベートし、pL10RAのHind回感位で切断した。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分面し、約0.5kb のDRA断片をDEAEペーパー法〔アレフェン(Dretzen)ら:アナリティカル・パイオケミストリィ(Anal. Biochem.)、112、295(1981)〕にて回収し、オリゴ(d6) 鎖付きのリンカーDNA(以下単にリンカーDNAと略記する)を得た。

上記で調製したボリ (A) RNA約4 M、ベクタープライマー約1.4 Mを50mM Tris-HCL (pH8.3)、8mM MgCL。、30mM KCL、
0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP、dTTP、dGTP およびdCTP) および10単位のリポスクレアーゼインヒピター(P-L Biochemicals 社製) からなる溶液22.3mに溶解し、10単位の逆伝写酵素

ピコモルおよび的記のリンカー DNA0.4ピコー モルを10mm Tris-HC & (pHT. 5) 、 O. 1 M NaC & および lell EDTAからなる溶液 180mに溶 かし、65℃、42℃、0℃でそれぞれ10分、25分、 30分間インキュペートした。20ml Tris-HCL (pH7.5) . 4mm M g C # . 10mm (NH.) .SU. 0.1% KCIおよび0.1mM B-NADの組成で、 全量1000㎡となるよう反応被を頑張した。抜反 応波に25単位の大脳菌DNAリガーゼ(ニュー イングランド・パイオラブズ社製)を加え、11 で18時間インキュペートした。故反応被を各40 μMOdNTP, 0.15eH β-NADとなるよ う立分を追加回撃し、18単位の大陸成DNAリ ガーゼ、20単位の大阪菌DNAポリメラーゼI (P-L Biochemicals社製) および10単位の大脇 直りポスクレアーゼH (P-L Biochanicals)と起) を加え、12℃、25℃で購次 1 時間ずつインキュ ペートした。上記反応で、cDNAを含む組後 えDNAの現状化と、RNA-DNA二重額の RNA部分がDNAに微挽され、完全な二重線

(単化学工業社員) を加え、41で80分類インキ ュペートし、mRMAに相補的なDNAを合成させ た。彼反応物をフェノールークロロホルム抽出、 エタノール沈澄を行い、RNA-DNA二重線 の付加したペタタープライマーDNAを回収し た。 体DNAを664M dCTPおよび0.2 pgポリ (A) を含むTdT提新技20mに熔かし、14単 位のTdT(P-L Biochemicals 社製) を加えて 37℃ 2 分間インキュペートし、cDNA3′末端 に20個の (dC) 値を付加した。 並反応物をフェ ノールークロロホルム抽出し、エタノール沈粛 により (dC) 紋の付加したcDNA-ベクター プライマーDNAを回収した。 波DNAを10aM Tris-HC & (pH7. 5) . Gel Mg C & . および60 mM NaCIからなる技 400㎡に拵かし、20単 位のHimd缸を加え、37七2時間インキュペー トし、Hind回郎位で切断した。故反応物をフ ェノールークロロホルム抽出、エタノール沈澱 して0.5ピコモルの (dC) 雄付加c DNAーペ クタープライマーDNAを得た。 抜DNA 0. 2

DNAの無後え体プラスミドが生成した。

(3) ヒトt-PA・cDNAを含む額換えDNA

の選択:

次に、コロニー・ハイブリダイゼーションを用い、ヒトセーアA・c DNA [ベニカ(Pennica ら:ネイチャー(Wature) 301. 214(1983)]の、セーアAシグナルベプチド環域の一部の塩基型列と一致する塩基の合成 DNA 5′ーATGGATGCAATGAAGAGGGGCTCTGCTGTー3′を***アで環境したプローブと会合するクローンとして、モーアA・c DNAを以下のようにして運搬した。

まず、②で得た額接え体プラスミドを用い、 大阪窗C 8 0 0 S P 8 株 (カメロン (Cameron) :プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・ アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA 72. 3418 (1975)] モハナハン の方法 (Hanahan:ジャーナル・オブ・モレキュ ラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 、166、 557 (1983)] に従い形質転換した。 られた約

10.000個のコロニーをハナハンとメセルソンの 方法【Hanahan and Mesalson:メソッド・イン ・エンザイモロジー (Nathods in Enzymology) 100 . 333(1983) 〕に使い、ニトロセルロース ・フィルター上に固定した。次に、フィルター のプレハイブリダイゼーションは、BxNET (1 × MBT=150mW N a C & 15mW Tris-HC & (pH7.5) 、left EDTA)、10× アンハルト (Denhardt)波、および 100㎏/elの衛片化した 大脇歯染色体DNAを含む溶液中、65℃、4時 間またはそれ以上の時間行った。このプレハイ、 プリダイゼーション溶液に上述の『Pで構造し たプローブを加え、フィルター上のDNAと会 合させた(65℃、16時間以上)。次に、フィル 9-48×SSC (1×SSC=150mM NaC &. 15mMタエン酸ナトリウム) で2回洗浄し(宝温、 5分間ずつ)、65での2×SSCと0.1% SDS を含む液で30分間洗浄した。さらに65での2× SSCとG1%SDSを含む故で15分間洗浄し た後、6×SSCで室温で2回洗浄した(5分

配すつ)。フィルターを空気を進した後、オートラジオグラフィーにより陽性タローン1 個を同定した。この陽性タローンが持つプラスミソロ・PA7のcDNAの塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シータエンス法により決定した。その結果、ptPA7のcDNAは、ベニカらが報告したtーPAのアミノ酸配列 [Penaica ら:ネイチャー(Bature) 301.214(1983)] と完全に一致するtーPAをコードしていることが判明した。ただし、成熟型tーPAの95季目のアスパラギン酸のコドン(ACA)と 512季目のスレオニンのコドン(ACA)がそれぞれGAT、ACCになっていることがわかった。

この歯株は、Bscherichia coliE t P A 7 FERM BP-1467として、数工研に客託されている。

参考例 2.

ヒトpro-UKc D N A を運ぶプラスミド pUKlの 造成:

参考例1で作成したDetroit 562 細胞のcDNA ライブラリーをコロニー・ハイブリダイゼーシ ョン法によりスクリーニングし、ヒトpro-UK cDNAクローンを単雄した。すなわち、まず、 参考例1で毎た組換え体プラスミドを用い、大 福建C60GSF8株 [カメロン (Cameron) : プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・ア カデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA <u>72</u>. 3416(1975)] をハナハンの方法 【Hanaban : ジャーナル・オブ・モレキュラー ・パイオロジー(J. Nol. Biol.) 、<u>166</u>、557 (1983)] に従い形質伝換した。得られた約30,000 個のコロニーをハナハンとメセルソンの方法 (Hansban and Meselson: メソッド・イン・エ ンザイモロジー (Nethed in Bazywology) 100 . 333(1983)] に従い、ニトロセルロース・フィ ルター上に固定した。次に、フィルターのプレ ハイブリダイゼーションは、 6×NET、10× デンハルト(Denkardt)被、および 100元/elの 断片化した大腸菌染色体DNAを含む熔液中、

65℃、4時間またはそれ以上の時間行った。 次に、ヒトpro-UKc DNA (ホルムズ(Holmes) ら:パイオテクノロジー(Bio/Technology)3. 923(1985)]のクリングル領域の一部の塩基配 列と一致する41塩基の合成 DNA

5'-66GAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC -3'
(本発明者らが単微したヒトpro-UKc DNAについていえば、第5表中の下線を付した塩基配列に相当する)を**Pで機識したブローブを、上のプレハイブリダイゼーション溶液に加え、フィルター上のDNAと会合させた(655で、16時間以上)。次に、フィルターを6×SSCで2回洗浄した(変温、5分間ずつ)後、1×SSCと0.1%SDSを含む57での液で30分間 売浄した。さらに1×SSCと0.1%SDSを含む57での液で15分間洗浄した後、6×SSCで2回洗浄した(変温、5分間ずつ)。フィルターを空気を埋した後、オートラジオグラフィーにより隔性クローン1個を固定した。この隔性クローンが持つプラス(ドゥびK1のcDNA

の塩基配列を、MI3ファージを用いたディデオ キシ・シータエンス扱により決定した(第5会)。 その結果、pUKiのcDNAは第5表のpro-以のアミノ歌芸基の番号付けに従った場合、pro -UK の41季日のCys残基より下流のpro-UKの 翻訳領域および3'非翻訳領域をコードしている ことが明らかになった。 p U K I の c D N A が コードしているpro-UKのアミノ東配列は、ホル ムズら〔Holmasら:パイオテクノロジー (Bio/Technology) 3. 923(1985)] の報告した ものと一致していたが、以下に示す4つのアミ ノ酸のコドンの3番目の塩基が異なっていた。 254番目のアミノ酸Aso : AAC→AAT 340番目のアミノ散Leu : CTA→CTG 345季目のアミノ取Pro : CCC→CCA 346季目のアミノ酸Gis : CAA→CAG この歯体は、Escherichia coli EUK1 FERM BP-1463) として、数工研に客

85で、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約530bp のDNA断片を精製した。一方、ノルランダーらが遊成したプラスミドDNApUC19 [Norrander. J. ら:ジーン(Gene) 28: 101(1983): pUC19プラスミドDNAは宝酒造社より入手できる]約1 減を20mmKC & を含む Y ー 0 級 断液30域に体かし、16単位の Sea [を加え、30 でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の

託されている。

新片を模型した。

参考例3.

このようにして得られたpRC19由来の約530 bpのDNA断片(約0.01元)とpUC19由来の約2.7 kbのDNA断片(約0.05元)とを20 MのT4リガーゼ級衝波に始かし、 200単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

熱処理後、AFT技を用い、約2.7 KbのDNA

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大器国HH294 株を形質伝換し、Ap耐性株をた。この形質伝換株からプラスミドDNA、PCCK1を単雄し、舒展酵素による構造解析

ト pro-UKc D N A を選ぶプラスミド p U K 1I. のみは:

参考例2で られたプラスミドpUK1かコードしているpro-UKcDNAはpro-UKのシグナル領域と成長因子メドイン領域を含んでいないので、以下に示す手順を用いて、これらの領域を含む cDNAのクローン化を行った。

まず、cDNAのタローン化に用いるペクター pCCK2の速波を以下のようにして行った。

(1) 組換えプラスミドゥCCKIの造成:

無野らが遊成した、ラット超コレシストキニン (CCK、約駆体のcDNAを有するプラス ミドpRC19 (最野ら: ジャーナル・オブ・パイオケミストリー(J. Biochem.) 96、923-926 (1984)] を持つ大価菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpRC19DNAを模製した。得られたpRC19DNA約3 域を30域の Y-50要衝波に熔かし、1単位のPvuⅡを加え、37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはPvuⅡにより部分的に消化された。

を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第15回参照)。

② 抵換え体プラスミドPCCK2の遊应:

上で得られたpCCK1プラスミドDNA的 2 成を30 MのY-0 最衝液に溶かし、12単位の SacIを加え、37℃で2 時間消化反応を行った。 さらに、1.5 Mの2M MaCAと10単位のBaeHI を加え、37℃で2 時間消化反応を行った。85℃、 10分間の無処理後、AFT法を用いて約0.55Kb のDNA断片を精製した。一方、後述の参考例 5 で得られたpTrS33プラスミドDNA約2 成を上と同じ反応に供し、生じた約2.85Kbの SacI-BamHI断片をAFT法を用いて精製 した。

このようにして得られたpCCK!由来の約 0.55KbのDNA断片(約0.02m)とpTrS33 由来の約2.85KbのDNA断片(約0.1 m)とを 20mmのT49ガーゼ級衝波に添かし、50単位の T4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合 反応を行った。 得られた組設之体プラスミドの混合物を用いて、大腸症 RH294体を形質転換し、Ap耐性体をた。この形質転換体からプラスミドOHAPCCK2を単維し、制限酵素による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを破据した(第16回参照)。

(3) ヒトpro-UKc DNAを選ぶプラスミドp UK 11の単数:

工業社会)を加え、41でで90分間保証し、mRNAに相補的なcDNAを合成した。核反応物をフェノールータロロホルム抽出、エタノール
沈最を行った後、40点の0.3 M NaOHに体
かし、37でに15時間放置することによって、mRNAを加水分解した。次に、10点の1 M Tria-HC4 (pH7.5) と40点の0.3 N HC4を加えて中和した後、1 本績 cDNAをエタノール沈最によって回収し、28.5点のH2Oに体解した。

この存放を、50eW Trim-BC L (pHS. 3) 、8eW M B C L 。 30mW K C L 、5mW DTT、1mW dNTP (dATP、dTTP、dGTP およびdCTP)、および2.5 m/el合成 UWA プライマー CATGAGAGCCCTGCTGG (ヒトpro-UKの シグナル・ペプチド領域の一部の攻基配列と一 数する) (全量40m) となるように腐棄した後、85でで10分間、続いて41でで30分間保温した。次いで10単位の逆伝写酵業を加え、41でで50分間保温することにより、1 本額c DNAを2 本類c DNAに変換した。該反応物をフェノール

ークロロホルム抽出、エタノール比較を行った 後、25mm NaCAを含むY-0級衝液30点 に存かし、25単位のBamH II (ニューイングランドペイオラブズ社製)を加え、50℃で2時間 前化反応を行った。さらに、1.25点の2M NaCAと12単位のBamH Iを加え、37℃で2 時間消化反応を行った。65℃、10分間の加熱後、 AFT法を用いて約1.1~1.4 KbのcDNA断 片を精製した。

一方、上で得られたpCCK2プラスミド DNA約2 Mを上と阿様にBssHEとBssHI で切断した後、AFT法を用いて約2.9 Kbの BssHI-BssHI斯片を得製した。

このようにして得られた的1.1~1.4 KbのcDNA新片(約0.0 2 Mg)とpCCK2由来の約2.9 KbのDHA新片(約0.0 5 Mg)とを20 MのT4.7 が一て破壊液に溶かし、200単位のT4.DNA.9 が一てを加え、4 でで18時間結合反応を行った。

得られた組役えブラスミド混合物を用いて、

大腸確C800SP8株を必賃転換することに より、約25,000個のAp耐性株を取得し、これら のAp耐性株の中から、参考例2に述べたコロニ ー、ハイブリダイゼーション法を用いて、参考 例 2 でpro-UKcDNAの単鍵に用いたプ ローブと同一のプローブと会合する陽性クロー ンを約1000要取得した。なお、ハイブリダイゼ ーションおよびフィルターの洗浄条件は参考例 2と同様であった。このようにして得られた脇 住クローン 1 株が持つプラスミアロびK11 (第 17団参照)を単雄し、pro-IXのシグナル・ペプ チド、成長因子ドメイン、クリングル・ドメイ ン領域の攻基配列をMI3ファージを用いたディ デオキシ・シークエンス依により決定した。そ の結果、その塩基配列は、ホルムズ〔Holaesら : ペイオテタノロジー(Bio/Technology) 3. 92 3(1985)] の報告したものと一致していた。 考例し

hG-CSPcDNAを選ぶプラスミドpCS P1-2およびpCSP2の改成 (L) 正常人末梢血マクロファージからのポリ (A) RNAの磁製:

正常人の末梢血より進心分離して得た白血球 をプラステッタボトルで培養し、非接着性の細 略を洗浄・除去することにより、接着性の細胞 であるマクロファージを単盤した。このマクロ ファージより、チオシアン酸グアニジンー塩化 リテウム法 [カサラ(Cathala) ら: ディーエヌ エイ (DNA) 2、329 (1983)] に従い、ポリ (A)を有するRNAを下記のごとく腐骸した。 正常人の末梢血 4 0 0 mlをHitachi RPR10 ロ ーターにて1800rpm 、20分間流心して血 単を沈殿させ、これを5 Oalリン酸緩衝食塩水 [NaC 2 8 g / 1 , KC 2 0. 2 g / 2 , 無水Na.HPO. 1.15g/4、KH.PO. 0.28/1 (pH7.2):以下PBSと終記す る】に懸潰した。この感濁液25mlをリンパ珠 分離液(ビオネティタス (BIONETICS)社製] 25 o!に重磨し、Nitachi RPR10 ローターにて1800 rpm 、3 (分間違心した。中間層の白血球を分

RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウ A. 1mM EDTA, 10mM Tris-HC4 (pH7.5) からなる溶液 1 0 mlに溶解 し、フェノールータロロホルムで放出後、エタ ノール沈殿により回収した。得られたRNA約 0.8 m & 10 mM Tris-HC & (gH& 0) および I mM EDTAからなる溶液 1 mlに放 かした。65℃、5分間インキュペートし、0.1 alの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ (dT) セルロース・カラム [ピー・エル・パ . イオケミカル (P-L Biochemical) 社盤] ク ロマトグラフィー (カラム体被 0. 5 el) にかけ た。吸着したポリ (A) を有するmRNAを10 mM Tris-HC& (pH7.5) および1 mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ (A) そ有するmRNA的30 Mを得た。

取し、等量のPBSで先浄(Bitachi RPRIO ロ ーターにて1500rpm 、10分析)した後、 5%の仔牛胎児血液を含む20mlのRPMI 1640年地(日水製薬社製)に、窓海し培養した。 将業には枢緯培養用フラスコ(コーニング社盤) を用いた。37℃で1.5時間培養した後、培養上 清を非接着性の細胞とともに除去した。気たに 20alの同培地と大価値リポ多額 (LPS)を0.3 mg /alとなるように加え、さらに37セで4時間 埼美した。次いで、培養液より 1,100×g、4 で、10分間の遠心によって避捻を集め、80 alのPBSで洗浄した後、5Mチオシアン酸ダ アニグン、10mM EDTA、50mM Tris ーHC4(pH7)および8%(マ/ヤ)2ーメル カプトエタノールからなる存在10ml中でポル テックス・ミキサーを用い可称化した。この可 溶化物を進心管に移し4M LiC A 溶液80ml を加えて復搾した後、4℃、20時間静度した。 Mitachi RPR10 ローターにて9,000 rpm 、90 分間違心後、RNAを比較として回収した。R

上記で簡製したボリ (A) RNA約3 AR. ベクタープライマー的1.4 AR を 50 mM TrisーHC & (pH&3)。8 mM Mg C & s.

30 mM KC & 0.3 mM DTT.2 mM
dNTP (dATP, dTTP, dGTPおよびdCTP) および10 単位のリボスタレアーゼインとピター (P-L Biocheeicals社会)からなる溶液 2 2.3 AR に溶解し、10単位の逆転写辞彙(生化学工業社会)を加え、41で90分間インキュペートし、mRNAに相続的なDNAを合成させた。核反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈設を行い、RNAーDNA二重線の付加したベクタープライマー

DNAを図収した。故DNAを88 AM .dC TPおよびC.2 Raff (A) を含むTd T級管 液20mに溶かし、14単位のTdT(P-L Biochemicals社員)を加えて3.7で2分間インキ ュペートし、c D N A 3 末端に約20 質の(d C) 領を付加した。故反応物をフェノールータロロ ・ネルム抽出し、エタノール沈殿により(d C) 粒の付加したCDNA-ベクタープライマーD NAを回収した。 XDNAを10mM Tris -HC& (pH7.5), 6mM MgC&, # よび60mM NaCIからなる嵌400gに 排かし、20単位のHind回を加え、37℃ 2時間インキュペートし、Hind 亚部位で包 新した。彼反応物をフェノールークロロホルム 抽出、エタノール沈殿してQ5ピコモルの (dC) 雄付加cDNAーペクタープライマーDNAを 得た。 核DNAO.2 ピコモルおよび前記のリン カーDNAC4ピコモルを10mM Tris -HC1(pH7.5), 0.1M NaC1出北び 1mM EDTAからなる溶液100世に溶か

し、85℃、42℃、0℃でそれぞれ10分。 25分. 3 0 分間インキュペートした。 2 0 m M Tris-HC & (pH7.5) , 4 mH Mg C & .. 10mm (NH.).SO. LIM KC 2x よび0.1mM B-NADの組成で、全量 1000世となるよう反応被を複製した。並反 応被に25単位の大鍋館DNAリガーゼ(ニュー イングランド・パイオラブズ社製)を加え、11 で18時間インキュペートした。 総反応権を名 40 MOD NTP. Q. 15 mM 8-NADE なるよう成分を追加額製し、10単位の大腸菌D NAリガーゼ。20単位の大阪幽DNAポリメ ラーゼ [(P-L Biochemicals社型) および 1 ①・. 単位の大路面リポヌクレアーゼH(P-L Biochemicals社製) を加え、12℃、25℃で順次1 時間ずつインキュペートした。上記反応で、 CDNAを含む転換えDNAの選状化と、RN A-DNA二重額のRNA部分がDNAに複換 され、完全な二重線 DNAの組換え体プラスミ ドが生成した。

CD hG-CSFcDNAを含む組接えDNAの 選択:

図で得られた組接え体プラスミドを用い、大 画像C 6 8 8 S F 8 株をスコット (Scott) らの 方法(重定要数: 都的工学 2.616(1982)) に 使い形質伝接した。得られた約9200個のコロニ ーをニトロセルロース・フィルター上に固定し た。長田ら〔長田 (Nagata) ら: ネイチャー (Nature) 319 , 415(1986)] が単離した h G ー C S F の成 熱タンパタ質のN 末端 9 アミノ酸に相当する27 塩基の合成 D N A

5'-ACCCCCCT6GGCCCTGCCAGCTCCCTG -3'モ**Pで根職したプローブに 6 0 ℃で強く会合した 2 歯状を選んだ (グルンステイン・ホグネス (Grunstein-Nogness)の方法、プロシーディング・オブ・デ・ナショナル・アカデミイ・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72.
3961 (1975)]。これらの歯状がもつプラスミドPCSP1-2およびPCSP2 が有する c DNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたデ

イデオキシ・シークエンス法により決定した。 その結果、PCSF1ー2およびPCSF2が 有するcDNAは、hG-CSFをコードして いることが判別した。プラスミドPCSF1ー 2 そ合む数生物は Bacherichia coli ECSF1-2 【PBRN 8P-1220】として、またプラスミドPC SP2を含む数生物は Bacherichia coli ECSP2 【FBRN 8P-2073】として数工研に寄 託してある。

参考例5

組換え体プラスミドpTrS33の造成:

(I) ATGペクターpTrS20の意成:

第18回に示した手順に従い、SD配列とA TG開始コドンの脳の距離が14塩基で、かつA TGコドンの直接にSaclサイトを有するA TGペクターpTrS20を造成した。

まず、特別的58-110800号公報記載の 方法で類似したpKYP10 3 MIをY-100 級衡波30Mに序かし、制限作曲Ban回と制限 辞書Nrul(ニューイングランド・パイナラ

特閉平 2-227075 (44)

プズ社製)をそれぞれ6単位ずつ加え、37℃で3時間切断反応を行った。この反応被からLG T技によりPtrpを含む約3.8 KbのDNA断 片(Bang-NruI断片)約0.5 減を得た。 一方、Ptrpの下流にATG開始コドンを 付与するために下記のDNAリンカーをトリエ ステル法により合成した。

Ban Hind Sac | Nru | 5'-C G A T A G C T T A T G A G C T C G - 3' (19-mor)
3'-T A T T C G A A T A C T C G A G C C (17-mor)

19-morと17-morの合成 DNA (各々10ピコモルずつ)を50mM Tris-RC & (pHT.5) 、10mM Mg C & s 、5 mMジチオスレイトール、0.1 mM E DT A および 1 mM ATPを含む全量 2 0 mmの存在に移かし、T 4 ポリスクレオテドキナーゼ 3 単位(宝河造社製)を加えて、3 7 でで 5 0 分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpKYP10由来のBanⅢ --Nrul断片(約3.8 kb) 0.1 mgと上記の DNAリンカー約0.5 ピコモルをT4リガーゼ

約3 80 4 3 0 2 6 0 Y - 0 級街後に終かし、12単 位のSaclを加え、37℃で2時間消化反応 を行った。さらに1.5 Mの2M NaC&と10 単位のPst!を加え、37℃で2時間箱化反 店を行った。85℃、IO分間の熱処理後、APT 法により的1.15KbのDNA斯片を精製した。 一方、韓陽昭52-48699 号公保記載の方法で選 製したpKYP26(pKYP26を含む大路度は Escherichia coli I K Y P 26 (FERM BP-883) として微工研に容託されている) 2 歳を30歳の Y-100級街波に辞かし、8単位のPat I と10単位のBamHIを加え、37セで2時間 消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理 後、AFT法により約1.7KbのDNA断片を積 異した。また、M13mp18R P D N A (Morrander, J. ら: グーン (Sone) 28 . 101(1983) : M 13ap 1889 DNA は宝酒造社より入事した) 2 度を30 #のY-0最新被に排かし、10単位のSac[モ加え、37℃で2時間消化反応を行った。さら E1.5moIM NaC1210单位のC1aI

要責義20点に修かし、さらにT4DNA9が ーゼ2 位を加え、4でで18時間結合反応を 行った。

得られた無接之体プラスミドの混合物を用いて大品値HB101株 [ポリバー(Boliver) ら
: ジーン(Geae) 2. 75(1977)] を影質転換し、
Aprのコロニーを得た。このコロニーの培養
酸体からプラスミドDNAを回収した。符られたプラスミドの構造は制限酵素とこのRI、
Ban回、Hind目、SacI、Nrulで
切断後、アガロースゲル電気水動により確認した。このプラスミドをpTrS20と名付けた
(第18回)。pTrS20のBan回、Hind回サイト付近の塩基配列は下記のとおりであることをM13ファージを用いたディデオキシ・シークエン気法を用い確認した。

SOR FU HIDDE SECT NEU I AAG AGET CG CGA

Ø pTrS33の登成: 上で得られたpTrS20プラスミドDNA

を加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法により的C.65 KbのDNA断片を精製した。これらとは別に、第19間に示す2種の合成DNA(43塩基と45塩基)

(43年至)
5'-CGATAAGCTTATGATATCCAACGTCGACGACGACGGCGTCGAACCATGGCCG-3'
3'-TATTCGAATACTATAGGTTGCAGCTGCTGCCGCAGCTTGGTACCGGCCTAG-5'

モアプライド・バイオシステムズ社380A・ DNA合成数を用いて合成し、それぞれ別々に 上に述べた方法と同じ方法を用いて5′ーリン酸 化した。

このようにして得られたpTrS20由来の約 1.15 KbのDNA斯片 (約0.1 M)、pKYP 28由来の約1.7 KbのDNA斯片 (約0.1 M)、 M13ap18由来の約0.8 5 KbのDNA断片 (約 0.05 M)、および5'-リン酸化された上記2 種の合成DNA (それぞれ I pecie ずつ)を20 がのT4 リガーゼを御波に体かし、50単位の丁 4 DNA リガーゼを加え、4 でで18時間結合反 あを行った。

このようにして掛られた起換え体プラスミド

マンハイム社会) を加え、37℃で2時間前化反応

『を行った』65℃、10分間の島島理後、APT依を

用いて的し5kb のDNA畜片を特製した。また、

第20回に示す2種の合成DNA(19塩基と23塩基)

をアプライド・パイオシステムズ社380A・DNA

合成機を用いて合成し、それぞれを買々に上で途 べた方法と同様の方法を用いて5'ーリン酸化した。

このようにして得られたりKYP26由来の約1.7

Kb のDNA斯片(約0.1 m)、pTrS20由来

の約1,15KbのDNA新片および5′-リン酸化され

た2種の合成DNA (それぞれipmoleずつ) を20

減のT49ガーゼ硬装液に移かし、50単位のT4

DNAリガーゼを加え、4 セで18時間結合反応を

得られた無挽え体プラスミドの混合物を用いて、 大路曲 MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。

この形質転換株からプラスミドDNA。pTerm

行った。

の混合物を用いて、大器館MM294株を形質 転換し、Ap耐性機を得た。こ 形質転換機か らプラスミドpTrS33を単離し、解除機構的 化による機道解析およびMI3ファージを用いた ディデオキシ・シータエンス技により、pTrS33 が目的の構造を有することを確認した(第19回 参照)。

参考例 6.

組接えプラスミドpTerm2の造成:

p K Y P 28プラス t Y D N A (特別昭 62-48699 号公祭) 約2 減を10mm Tris-HC & (pH 8.9)、75mm Na C & 、7mm Ma C & 。、8 mm 2 ーメルカプトエタノールを含む溶液30減に溶かし、16単位のAmp 718 (ペーリンガー・マンハイム社製)と10単位のP s t 『を加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、A F T 法を用いて約1、7Kb の D N A 断片を複製した。一方、参考例5 の (1)で移られた p T r S 20プラス t Y D N A 的2 減を30減の Y - 1 0 0 級衝波に溶かし、8 単位のP s t 『と10単位のN r u 』 (ペーリンガー・

2 を単微し、制限酵素液化による構造解析および M13ファージを用いたディデオキシ・シークエン ス法により、pTerm2が目的の構造を有する

ことを確認した(第20回参照)。 44条例7

組換え体プラスミドpTSF18の造成:

#考例1で得られたヒトtーPAcDNAを選

ポプラスiPptPATを持つ大脳間C.600SP
8株の特美菌体から常法によりptPATDNA
を顕製した。得られたptPATDNA的2版
をY-100級新板30域に排かし、制限酵業Bal
I8単位を加え37でで2時間消化反応を行った。
55で、10分間の熱処理後、APT法を用い、約
20KbのDNA断片を精製した。次に pTrS
33DNA(参考例5)約2度を30域のY-100
級衝波中で10単位の制限酵業BamHIを加え、
37でで2時間消化反応を行った。85で、10
分間の熱処理後、APT法を用い、約28Kbの
DNA断片を精製した。

このようにして移られたptPA7由来の約2.0 KbのDNA断片(約0.1 kg)とpTrS3.3由来の約2.8 KbのDNA断片(約0.1 kg)を、全量20 dのT4.9 が一ゼ級新被に体かし、T4.DNA.9

ガーゼ50単位を加え、4 でで18時間結合反応を行った。

得られた想換え体プラスミヤの混合物を用いて、 大器機MM 294株を形質転換し、Ap 耐性株を得た、この形質転換機からプラスミヤDNApTS F10を単雄し、創製酵業消化による構造解析を 行ったところ、目的の構造を有することを触返した(第21図参照)。

包挟え体プラスミドpTA4の造成:

実施例7より得られたpTSF10プラスミドDNA約3度をY-0級衝波30点に体かし、 12単位の新限弊無Kpnlを加え、37℃で2時 関抗化反応を行った後、1.5点の3MNaC1と 12単位の制限酵素BstEI(ニューイングラン ドバイオラブス(New England Biolabs) 社製]を 加え、36に80℃で2時間抗化反応を行った。 鍵いてAPT法を用い、約0.3KbのDNA断片を 精製した。

これとは別に、大腸歯【GHA2(微工研 FBRM

8P-400)を培養し、培養館体から常統によりpGHA 2プラスミドDNA (特別昭80-221091) を開製 した。得られたpGHA2DNA約2点を30点 Y-10 (装置被に修かし、8単位のPat I と8単位のBs 4 日を加え、37 でで2時間前化 反応を行った。85で、10分間の熱処理後、 APT技を用い、約0.7.5 KbのDNA衛件を精製 した。

また、PtPA?DNA(参考例1)約3元を3.0㎡のY-150級衝波に体かし、10単位のBs & II を加え、37でで2時間消化反応を行った後、12単位のBstEIIを加え、さらに60でで2時間消化反応を行った。続いてAPT法を用い、約1.55KbのDNA断件を報酬した。

また、参考例 8 で得られたpTerm 2 DNA 約 2 成を 3 0 成の Y - 6 級衝波中で 1 2 単位の Kpn I を加え、37℃で 2 時間消化反応を行った 後、1.5 成の 2 M Na C & と 8 単位の Pet I を加え、 5 らに 3 7 ℃で 2 時間消化反応を行った。 額いてAPT法を用い、約 1.7 1bの DNA 断片を

オケミストリー(J. Biochem.) 101 . 1307— 1310(1987)] を持つ大協館HB1 8.1 株を培養 し、培養媒体から常法によりpAGE28DNA を解験した。得られたpAGE28DNA約2㎡ そ30m(のY-160級告後に溶かし、8単位の Xholと12単位のScalを加え、37でで2 時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理 後、AFT技を用いて約2.8 KbのIKA 断片を持 製した。一方、本発明者らによって造成された プラスミドゥAGE103(水上ら:ジォーナ ル・オブ・パイオケミストリー (J. Bioches,) 101 , 1307-1310(1987)] を持つ大阪衛HB10 1株を培養し、培養機体から常法によりpAGB103 DNAを募集した。得られたpA6B103DHA約3点 を30㎡のY-1 0 C 経療液に体かし、10単位の ECoR1を加え、37℃で2時間消化反応を 行った。フェノール独出とクロロネルム抽出の 後、エタノール沈漱によってDNA 断片を回収し た。このDNA断片を全量40㎡のポリノラー ゼ暴着後に体かし、8単位のタレノー新片を加

横弧した。

このようにして得られた《種種のDNA所片 (pTSP10由来の新片0.03元、pGHA2 由来の断片0.05元、ptPA7由来の断片0.1 元、およびpTerm2由来の断片0.1元)を20 足のT49ガーゼ級衝波に添かし、200単位の T4DNA9ガーゼを加え、4でで18時間結合 反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、 大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNApTA 4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した (第22閏参照)。

参考例 9.

t ーPA発現プラスミ Y pS81PA [S81dbfr] — 9Aの 遊成:

(1) 組換え体プラスミドPAGE105Mの遊成:本発明者らによって遊成されたプラスミドPAGE28(水上ら:ジャーナル・オブ・パイ)

え、15℃で1時間反応させることにより、E coRI実出末端を平坦末端に変えた。反応を フェノール抽出によって止め、クロロホルム抽 出を行った後、エタノール沈æによってD-N A 断片を囲収した。このDNA断片を30mのY -100級衡被に熔かし、12単位のXhoI を加え、37セで2時間消化反応を行った。65 で、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約 C. 4 KbのDNA断片を模製した。また、O'Hara・ らによって遊成されたプラスミドロKCR [C'Haraら:プロシーディング・オブ・ザ・ナ ショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA 78. 1527(1981)] & 持つ大い個HBIGL株を培養し、培養団体か ら常法によりpKCR・DNAを腐襲した。得 られたpKCR・DNA的2減を30減のY-150 級皆被に添かし、12単位のBanfi と16単位の Sa 【 】を加え、37℃で2時間消化反応を行っ た。フェノール抽出とタロロホルム抽出の後、 エタノール沈麓によってDNA斯片を図収した。

このDNA断片を全量40点のポリメラーを接着 後に移かし、8 位のケレノー断片を加え、15 でで1時間反応させることにより、BamH! 実出末端とSa&I実出末端を平坦末端に変え た。85で、10分間の他処理の後、AFT技を用 いて的1.85KbのDNA断片を積製した。

このようにして得られた p A G E 28由来の約2.8 Kbの D N A 断片 (約0.05 m)、 p A 68103 由来の約0.4 Kbの D N A 断片 (約0.03 m)、 および p K C R 由来の約1.85 Kbの D N A 断片 (約0.2 m)を20 mの T 4 リガーゼ 優価液に 体かし、300単位の T 4 D N A リガーゼを加え、4 t で 18 時間給合成 応を行った。

このようにして得られた抵接え体プラスミヤの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質 転接し、カナマイシン(以下、Kaと略記する)耐性株を得た。この形質転換株からプラスミヤ PAGE105Mを単離し、耐暖酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第23図参照)。

図 t-PA発現プラス t PpSB1PA1-5 の造成:

上で得られた「AGE106DNA約2 成年30点のY-0種価核に存かし、12単位のKpalを加え、37でで2時間消化反応を行った。さらに、L5点の2M NaC&と10単位の8aeHIを加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の無処理後、AFT法を用いて約5.0 KbのDNA 衛片を持襲した。一方、参考例1で得られた「tPA7プラスミドDNA約3 成を75mM NaClを含むY-0 経過液30点に存かし、12単位のFoklと、12単位のEcoRIを加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の無処理後、AFT法を用いて約0.7 KbのDNA 断片を模製した。また、第25回に示す2種の合成DNA(21度基と21度基)

5'-GATCCATGGATGCAATGAAGA -3' (21堆基) 3'-GTACCTACGTTACTTCTCTCC -5' (21塩基) モアプライド・パイオシステムズ社380A・ DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別々に 実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5' -1ン酸化した。 ② 紅換之体プラスギドゥAGE106の過度: 上で得られたゥAGE105M・DNA約2 成を30点のY-100級看後に済かし、12単位のScale加え、37でで2時間満化反応を行った。85で、10分額の熱処理後、APT法を用いて約5.0kbのDNA新片を模製した。一方、実施例1と同様の方法で、5′ーリン酸化されたEcoR[リンカーを類製した。

このようにして得られたpAGE105M由来の約5.0 KbのDNA断片(約0.1 点)と1ピコモルの5'ーリン酸化されたEcoRIリンカーを20点のT4リガーゼ級衝液に添かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

得られた超換え体プラスミドの混合物を用いて、大届盛MM294株を形質転換し、Kea計性株を得た。この形質転換体からプラスミドDNApAGE108を単雄し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pAGE108は目的の構造を有することを確認した(第24図参照)

このようにして得られたPAGE106由来の約5.0 KbのDNA断片(約6.1 M)とptPAT由来の約6.7 KbのDNA断片(約6.1 M)、参考例8で類似されたPTA4由来の約1.4 KbのEcoRI-KpnI新片(約6.8 5 M)、および上で得られた5'-9ン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmoio ずつ)を20MのT4リガーゼを加え、4 tr18時間結合反応を行った。

得られた無独之体プラスミドの混合物を用いて、大器磁MM294株を形質転換し、Kee配性 株を得た。この形質転換体からプラスミドDNA pSE1PA1-5を単雄し、制限群素消化に よる構造解析およびM13ファージを用いたディ デオキシ・シータエンス法により、pSE1PA1-5 が目的の構造を有することを確認した(第25回 原)。

(4) tーPA発現プラス t KpS81PA1 - 9 の遊成: 上で得られたpSE1PA1-5 DNA約2

時を30mのY~0級仮装に添かし、12単位の Kpn I を加え、37でで2時間前化反応を行っ た。さらに、L5点の2M NaClと8単位 のHinduを加え、37℃で2時間歳化反応を 行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を 用いて約5.0KbのDNA断片を精製した。一方、 PSEIPA1-5DNA的2度を30度のY-O 緩衝液に体かし、12単位のKpn I を加え、 37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.0 ≓の2M NaCleと10単位のNcolを加え、 37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間 の鳥処理後、APT法を用いて約49KbのDNA 斯片を構製した。また第28間に示す4種の合成 DNA(47塩基、49塩基、49塩基および47塩基 : これらの合成DNAはt-PAcDNAの5' 非朝奴領域の一部を構成する)

(47版基) 5'-ABCTTEABATCCTACAGGAGTCCAGGGCTGGAGAGAAAACCTCTGCG-3' 3'-ACTCTAGGATGTCCTCAGGTCCCGACCTCTCTTTTGGAGAGACGCTCCTTT-5' (49版基)

(49地基) 5'-AGEAAAGGGAAGGAAGCAAGCCGTGAATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAAT-3' 3'-CCCTTCCTCGTTCGGCACTTTAAATTCCCTGCGACACTTCGTTAGTAC-5' (47地基)

> (A) 和快えプラスミドp U C 19 H の造成 (A p)計 住遺伝子のポータブル化):

ノルランダーらが造成したプラスミYDNA pUC19 (Morrander, J. 5:9-> (Gens) 26. 101 (1983) : pUC 1 9 7 5 X 2 PD NA は宝価遊社より入手できる〕を持つ大器歯#8101 株を培養し、培養菌体から常法によりpUC19DNA を研製した。得られたpUC19DNA的2mを 30㎡のY-50級価後におかし、10単位のHind立 と1単位のDTalを加え、37℃で1時間消化 反応を行った。この反応により、DNAはNiad 正で完全に、Dralで部分的に液化された。 85℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約 1.55KbのHind皿-DraJ断片と約1.1 KbのDraIーHind回断片の2種のDNA 野片を精製した。房に、20ピコモル(paoles)の Hisd 並リンカー(CAAGCTTG:コラポレイティ ブ・リサーテ社員)を実施例しで述べた方法と、 四様の方法を用いて5'ーリン酸化した。

このようにして られたりびじ19由来の的

をアプライド・パイオシステムズ社38GA・ DNA合成職を用いて合成し、それぞれ別々に 実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5° ーリン酸化した。

このようにして得られたpSE1PA1-5 由来の約5.0 KbのDNA断片(約0.1 m)と pSE1PA1-5 由来の約4.9 KbのDNA断 片(約0.1 m)と5'-リン酸化された4種の合 成DNA(それぞれ1 paole ずつ)を20 mの T 4 リガーゼ級衝技に体かし、50単位の T 4 DRA リガーゼを加え、4 でで18時間結合反応を行っ た。

将られた級換え体プラスミドの混合物を用いて、大陽歯MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミド DNA PSE1PA1-9 モ単雄し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス技により、pSB1PA1-9 が目的の構造を有することを確認した(第26回参照)。

1.5 5 KbのDNA断片 (0.0 3 m) と約1.1 KbのDNA断片 (0.0 3 m) および1 ピコモルの5'ーリン酸化されたHind エリンカーを20meのT4 リガーゼ級衝滅に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4 でで18時間結合反応を行った。

将られた包換え体プラスミドの複合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質板換株からプラスミドDNApUC19Hを単離し、料理酵業消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第27団参照)。

四 組装え体プラス t FpS81FA1-9Aの遊成 (pSB1FA1-9 への A p 耐性遺伝子の挿入) :

上で得られたpUC19HプラスミドDNA 約2両を30mのY-50級音波に溶かし、8単 位のHind取と8単位のPruIを加え、37 でで2時間消化反応を行った。フェノール抽出 とクロロギルム抽出の後、エタノール沈歳によってDNA断片を回収した。このDNA断片を

全量40mのポリメラーゼ運行液に歩かし、 R 位のタレノー新片を加え、15℃で1時間反応さ せることにより、Hind缸実出末端を平坦末 時に変えた。65℃、10分間の熱処理後、AFT 益を用いて的 L 4 Kbの D N A 断片を精製した。 一方、上で得られたヒーPA発現プラスミド pSEIPAI-9約2点を30点のY-150 被 番波に抜かし、8単位のXhcIと8単位の EcoRVを加え、37℃で2時間消化反応を行 った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用 いて約5.9 XbのDNA旅片を鋳製した。また、 上で編製したpAGE28プラスミソDNA約3 成を30点のY-150 優衡波に溶かし、10単位の Xholと10単位のEcoRVを加え、37でで 2時間消化反応を行った。85℃、10分間の無処 理後、AFT法を用いて約CLB 5 KbのDNAM 片を精製した。

このようにして得られたpUC19H由来の的 1.4 KbのDNA断片(約0.1 元)とpSBIPA1-9 由来の約5.9 KbのDNA断片(約0.1 元)と PAGE28由来の約0.85Kbの0FA 所片(約0.05 点) を20点のT4リガーゼ級指摘に添かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

得られた超換之体プラスミドの混合物を用いて、大阪歯MM294株を形質転換し、Apと Kmの両方に耐性になった株を得た。この形質転換株からプラスミドDNApSEIPA1-9A を単離し、制限母素消化による場政解析を行っ たところ、目的の構造を有することを確認した (第28回参照)。

プラスミドDNA pS81PA1-9Aを含む微生物は Escherichia coli 8bPA1-9A PERM 8P-1460と して昭和 6 2 年 9 月 3 日付で微工研に寄託して ある。

(7) 植換え体プラスミドpSBidhfriAの登成:

上で得られたpAGE106プラスミドDNA的2点を30点のY-50級衝放に溶かし、12単位のAsp718(ペーリンガー・マンハイム社製)を加え、37℃で2時間消化反応

を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈繋によってDNA断片を図収した。このDNA断片を全量40歳のポリメラーゼ級衝波に移かし、8単位のタレノー断片を加え、15で1時間反応させることにより、Asp718実出来増を平田であることにより、いてフェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈数によって回収したDNA断片を全量30歳のY-150級衝波に移かし、10単位のM1uIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT使を用いて約3.3 KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、dhfr遠伝子を選ぶpSV 2 dhfrプラスミドDNA (スプラマニ(Subramani) ら: モレキュラー・セルター・パイオロ ジー (Yol. Call. Biol.) 1 .854 (1981)] 約3 mを30 xtのY-100 報告液に溶かし、 12 単位のBgllを加え、37 でで2時間消 化反応を行った。フェノール抽出とクロロネル

ム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA質 片を回収した。このDNA断片を全量40点の ポリメラーゼ経済技に称かし、5単位のクレノ 一斯片を加え、15℃で1時間反応させること により、Bg & I 奥出来増を平坦末端に変えた。 狭いて、フェノール抽出とタロロネルム抽出の 後、エタノール沈殿によって四収したDNA版 片を全量30点のY-100種指液に歩かし、 12単位のHindmを加え、37℃で2時間 消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理 後、APT法を用いて約0.75 KbのDNA転片 を精製した。また、上で得られたpSEIPA 1-9AプラスミドDNA約3点を30点のY -100機衝波に溶かし、12単位のHind 耳を加え、37℃で2時間液化反応を行った。 さらに、1.5 MOIM NaCAと12単位の M L u l を加え、37℃で2時間消化反応を行 った。85℃、1·0分間の無処理後、AFT抜 を用いて約2.9 KbのDNA断片を精製した。 このようにして られたpAGE108由来の

DNA断片(約0.1 mm)とpSV2dhfr由 来のDNA断片(約0.0 3 mm)とpSE1PA 1-9A由来のDNA断片(約0.1 mm)を20 MのT4DNAリガーゼ級衝波に溶かし、100 単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18 時間結合反応を行った。

得られた観換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を恐覚転換し、Ap針性株を得た。この恐覚転換株からプラスミドDNApSEldhfrl-SEldhfrl-SAの造成と対することを確認した(第29回参照)。

Ø 超換え体プラスミドpSElPAISEldhfrl-SAの造成:

上で得られたpSEldhfrlAプラスミ PDNA約3 Mを30 MのY-100 優価液に 溶かし、12単位のXholを加え、37 でで 2時間消化反応を行った。フェノール抽出とタ ロロホルム抽出の後、エタノール沈政によって DNA新片を囲収した。このDNA新片を全量

出とタロロホルム抽出の後、エタノール沈敷によって回収したDNA断片を全量30㎡のYー150級術被に添かし、12単位のM&ulを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の無処理後、AFT法を用いて約6.75 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSE1dhfr1 A由来のDNA断片(約0.1 kg)とpSE1P A1-9A由来のDNA断片(約0.1 kg)を 20 klのT4リガーゼ級衝披に称かし、100 単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大器機MM 2 9 4 株を形質伝接し、Ap 耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNAp S E 1 P A 1 S E 1 d h f r 1 - 9 A を単載し、制限解素液化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第29回 順)。

40 屋のボリメラーゼ要衝液に溶かし、6 単位のタレノー断片を加え、15 でで1 時間反応させることにより、X h a l 突出来端を平坦来端に変えた。続いて、フェノール抽出とタロロホルム抽出の後、エタノール沈默によって回収したDNA断片を全量30 屋のY-150 優衝波に溶かし、12単位のM & u l を加え、37でで2時間前化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、A F T 法を用いて約4.4 KbのDNA断片を特製した。

これとは別に、上で得られたpSE1PA1
ー 9 AプラスミドDNA約3 叫を3 0 叫のYー
5 0 最衝被に溶かし、1 2 単位のC 2 a I を加
え、3 7 セで2 時間前化反応を行った。フェノール指出とクロロホルム抽出の後、エタノール
沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40 叫のポリメラーゼ緩衝被に溶かし、6 単位のクレノー断片を加え、15 セで
1 時間反応させることにより、C 2 a I 突出末 超を平坦末端に変えた。彼いて、フェノール治

参考例18.

hG-CSF発現プラスミドpAS3-3の 造成: (第30および31図参照)。

(1) 租技人体プラスミドpCSF3-3の造成: 参考例4で得たpCSF2、2成を20点の Y-150級筋技に溶かし、制限酵業Sa4I を10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限酵業ApaLIを5単位加え、37℃で5らに10分間部分切断反応を行った。この反応核からLGT法により、約40 KbのDNA断片(Sa4I-ApaLI断片) 約1.5 成を得た。

一方、hG一CSPの翻訳領域を完全に含む cDNAを得るために、下記に示した3つのD NAリンカーを合成した。 Sa # 1 5' TCGACGGAGCCTGCAGCCCAGCCCACCC- 3' (29mor) 3' GCCTCGGACGTCGGGTCGGGTCGGGTCTGGG- 5' (31mor)

Ncal ーー・・・グナル配列 ーー・・・
i -30
ii NotalaGlyProAlaThrGloSorPro
5'-AGACCEATAGGCTGGACCTGCCAGAGCCC-3'
3'-TAGCGACCTGGACGGTGGGTCTCGGGGTAC-5'

(32mer) (30mer)

Apali

-20
-10
NetLysLeuMetAlaLeuSinLouLouLouTrpHisSdr
5'-CATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGCTGCGCCACA - 3' (39mer)
3'-TTCGACTACCGGGACGTCGACGACGACACCGTGTCACGT- 5' (39mer)

上に示した29mer、31mer、32mer、30mer および39mer(2種)の一本値DNAは、アプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。
互いに相補的な29merと31merは各々20ピコモルずつを40meのT4キナーゼ級衝滅に添かし、T4ポリスクレオテドキナーゼ6単位を加えて、37でで60分間リン酸化反応を行った。互いに相補的な32merと30merおよび39mer両志についても同様にしてリン酸化

反応を行った。

反応放からしGT法により約0.7 KbのDNA斯片(Dral-Sall新片)約0.6 度を得た。これとは別に、参考例9で得たpAGE106、2 成を30 20のY-0 優価液に添かし制限酵素。Small 0単位を加え、37 でで2時間切断反応を行った。その後、NaCl温度が150mMになるようにNaClを添加し、制限酵素Sallを10単位加えて、37 ででさらに2時間切断反応を行った。この反応液からしGT法により約5.0 KbのDNA断片(Smal-Sall新片)約1.5 成を得た。

次に上記で得た、pCSF3-3由来のDra I-Sa4新片(約0.7 kb)約0.6 MとpAG E108由来のSmaI-Sa41新片(約5.0 kb)約1.0 MをT4DNA9が一せ級衝波25 Mに移かし、400単位のT4DNA9が一せ を加え、4で18時間給合皮店を行った。

上記で移られたpCSP2由来のSallーApaLI断片(約4.0 kb) 0.1 減をT4DN Aリガーゼ級新液30 減に体かした後、上記3 紙のDNAリンカーを2ピコモルずつ加えた。 さらにT4DNAリガーゼ400単位を加え、4でで18時間結合反応を行った。

鉄反応放を用いて大鶴曲HB101株を形質 伝換し、Ap耐性株を取得した。鉄形質転換株 よりプラスミドDNAを単離し、制限酵素切断 による構造解析を行った結果、目的とするプラ スミドDNA、pCSF3→3 であることを確 認した。

つ hG-CSF発現プラスミドpSE1GC
3-3の速域:

前項で得たPCSP3-3、3 減を40 減の Y-0級情報に溶かし前限酵素Dra[10単位を加えて、37℃で2時間消化反応を行った。 NaC4減度が150mMになるようにNaC4 を添加し、制限酵素Sa41を10単位加えて、 37℃でさらに2時間切断反応を行った。この

構造解析を行った結果、目的とするプラスミド DNA、pSE1GC3-3であることを確認 した。

四 hG-CSF発揮プラスミドpAS3-3 の盗点:

活させた後、エタノール沈殿でDNAを回収し た。 回収したDNAは20点のK-50級番枚 "に徳かし制限罪業人at【《夏洋紡績社盤》 10 位を加えて37で2時間切断反応を行っ た。この反応後よりLGT扱により約Q2gbの DNA斯片 [Ddel (平坦末崎).-Aat [・断片】的の1歳を得た。

別に前項で得たpSEIGC3-3の2点を ・20月のK-50級街後に移かし、制限群集 A a t E (東洋紡績社製) 1 C 単位を加え、 37℃で2時間消化反応を行った。その後、紡 限酵素×holを10単位加え、37セでさら に 2 時間前化反応を行った。この反応被より LGT法により約0.8 KbのDNA断片(Aat I-XhoI新片)的Q.1点を得た。

一方、参考例 9 で得たpSB1PA1SB1dhfr1-9Aの ・2 成を20 MのY-0 紙質液に溶かし、制限率 非Smalを10単位加え、37℃で2時間消 化反応を行った。その後、NaC & 濃度が100 参与例11. mMになるようにNaCIを添加し、制度酵素

多方例でで得られたヒトpro-UScDNAを選ぶプラ スミドゥUKIを持つ大猫鷹CBOOSF8株か ら常法によりpUKIDWA を顕製した。得られたpUKL DHA 的 2 成を Y - 100 級告後30点に熔かし、 8 単 位の制限群業 Fcolと8単位の Stulを加え、 37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間 の無処理後、AFT法を用いて約1.2 KbのDNA 新片を精製した。一方、参考例5で得られたpTrS 33プラスミVDNA的2減を10mM Tris-HCl(pH 7.5)、25mM KCl、ToN MgCl。、6mM 2 ーメルカブ トエタノールを含む体液(以下、"K - 25級街液" と略称する) 30以に修かし、16単位の財際酵素 Smal を加え、30℃で2時間消化反応を行った。 続いて1.5 Mの1 M BaCl と10単位の Bcol を加 え、さらに37℃で2時間常化反応を行った。65℃、 10分間の熱処理後、APT 故を用いて約2.8 5 Kb のDNA断片を特製した。

このようにして掛られたり以来1由来の約1.2 KbのDNA新片(約0.0.5 gc)とpTr\$33由来の約 2.85 KbのDNA断片(約0.1 kg) を、全量20ml

Xholを10単位加え、37℃でさらにで時 間消化反応を行った。この反応被からLGT法 により約8.7 kbのDNA新片 (Smal-Iho!新 片)約1歳を得た。

上記のようにして界たりCITA1由来の DdeI (平坦宋姆)、AatI斯片(約0.2 Kb)的C.1 Mc、pSEIGC3-3由来のAat I-XhoI断片 (約0.8 Kb) 約0.1 kg、pS ElPAISEIdhfr1-9A由来のSm a 1 - X h a 1 断片 (約8.7 Kb) 約 1 应を3 0. ■のT4DNAりがーゼ級街液に溶かし400 単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18 時間結合反応を行った。波反応波を用いて大攝 部HB101株を形質転換し、Ap耐性株を得 た。彼形質伝接株よりプラスミドを単載し、舒 限群集切断による構造解析を行った結果、目的 の構造を有するプラスミドDNA、PAS3-3であることを確認した。

租換え体プラスミドロUKA2の造成:

のT4リガーゼ級衝放に帯かし、T4DNAリガ ーゼ100単位を加え、4℃で18時間結合反応を 行った。

得られた鉱換え体プラスミドの混合物を用いて、 大陽塵MM294株を形質伝換し、Ap耐性株を 得た。この形質転換体からプラスミドDNA、p UKA2を単離し、制限群業消化による構造解析 を行ったところ、目的の構造を有することを確認 した(第32回参照)。 参考例12. ·

程技え体プラスも PpUKBIG1 の造成:

上で得られたpUKA2プラスミドDNA的2 ルモY-0級衝波30㎡に溶かし、12単位の斜限群 弗 Kpol を加え、37℃で2時間消化反応を行った。 続いて1.5 Mの2 N BaClと10単位の Ncolを加え、 さらに37℃で2時間前化反応を行った。85℃、10 分間の熱処理機、AFT性を用いて約1.2 KbのD NA断片を精製した。一方、 考例5で得られた pTrS33プラスミドDNA約2 麻を30点のKi-25級 香液に熔かし、16単位の Sea [を加え、30℃で 2

特開平2-227075 (53)

時間清化反応を行った。続いて1.5 点の2 M HaC1 と10単位の Patl を加え、さらに37℃で2時間積化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AP T按を用いて約1.1 5 KbのDNA断片を得襲した。また、参写例6で得られたpTerm2プラスミドUNA約2点を30点のY-0 級衝液に溶かし、12単位の Kpn I を加え、37で2時間消化反応を行った。続いて1.5 点の2M HaC1 と10単位の Patl を加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT技を用いて約1.7KbのDNA断片を得製した。また、下記2種の合成DNA (41mer と45mer)をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

5'— GGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3' (41mer)
'- CCCTTACCAGTGAAAATGGCTCCTTTCCGGTCACTGTGGTAC-5' (45mer)

これらの合成DNAを20ピコモル(pmoles)ずつ別々に、20mmのT4キナーゼ級衝液中で5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを加え、37でで30分間反応させることにより、合成DNAの5*末端をリン製化した。

のMcolと12単位のHind回を加え、37でで2時 間角化反応を行った。65℃、10分間の無処理後、 APT決を用いて約0.45KbのDNA新片を精製し た。一方、実施例11の以で得られたりひKA2プ ラスミYDNA的2m+30mのY-0 経貨液に溶 かし、16単位のKpniを加え、37℃で2時間液 化反応を行った。続いてL5mmの2M NaC4 と10単位のNcolを加え、さらに37℃で2時間 **排化反応を行った。65℃、10分間の焦熱理後、** APT法を用いて約1.2 KbのDNA腐片を精製し た。また、参考例6で得られたpTarm2プラ スミドDNA約2点を30点のY-B線指波に拡か し、10単位のKpmlを加え、37℃で2時間前化反応 を行った。続いて1.5mの2M NaCドと8単 位のHind IIを加え、さらに対して2時間消化 反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT 法を用いて的2.85KbのDNA新片を練覧した。

このようにして称られたpUK11由来の 0.45 KbのDNA断片 (約0.02元)、pUKA2由来の 約1.2 KbのDNA断片 (約0.05元)、および このようにして移られたpUKA2由来の約 1.2 KbのDNA断片(約0.0 5 kg)、pTrS33由来 の約1.1 5 KbのDNA断片(約0.0 5 kg)、pTerm 2 由来の約1.7 KbのDNA断片(約0.0 5 kg)、 3 および5'リン酸化された2種の合成ONA(1 ピコ モルずつ)を全量20点の下4 リガーゼ級衝液に搾 かし、300 単位の下4 DNAリガーゼを加え、4 でで18時間結合反応を行った。

得られた叙換え体プラスミドの複合物を用いて、 大陽週間294株を形質伝換し、Ap耐性株を得た。 この形質伝換株からプラスミドDNA、pUKB 101を単雄し、制限酵素剤化による構造解析お よびM13ディデオキシ・シークエンス法による塩 基配列決定を行ったところ、pUK8101は目的の構 強を有することを確認した(第33回参照)。 参考例13.

ヒトpro-UK発現プラスミYpSElUKprol-1A の造成:
(1) 紙換えプラスミYp UK P 2 の造成:

参考例 3 で得られた p U K 11プラスミ P D N A 的 3 点を30点の Y - 100 級板板に拾かし、12単位

pTerm 2 由来の2,85KbのDNA断片(約0,05 m) を全量20mのT4リガーゼ級衝波に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

呼られた起接え体プラスミドの混合物を用いて、 大陽腐¥M294 株を形質伝接し、Ap耐性株を得た。 この形質伝接株からプラスミドDNA、pUKF & を単粒し、制限酵素液化による構造解析を行っ たところ、pUKF をは目的の構造を有すること を確認した(第34回参照)。

② 複換えプラスミドpUKPproの造成:

上で得られたpUKF2プラスミドDNA的 2 成を30点の25mM NaClを含むY-0 優価被 に修かし、10単位のBmHT (ニューイングランド ・パイオラブズ社製)を加え、50でで2時間消化 反応を行った。彼いで1.0 点の2M HaCl と10単位 のHind面を加え、さらに37でで2時間消化反 応を行った。65で、10分間の熱処理後、AFT法 を用いて約4.3 KbのDNA断片を精製した。一方、 下記8種の合成DNA(39mor、41mor 41mor 41mo 39mer、 17mer、17mer)を上で述べた方法に従い、 合成および5'一末端のリン酸化を行った。

5'-AGCTTGTCCCCECAGCGCCCGTCGCGCCCTCCTGCCGCAG- 3'(39mor)

3'-ACAGGGGCGTCGCGGCAGGAGGACGGCGGTGG- 5'

5'-GCCACCGAGGCCGCCGCCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCAC- 3'(41mor)

3'-CTCCGGCGGCGGCAGATCGCGGGGCTGGAGCGGTGGTAC- 5'

5'-CATG AGA GCC CTG CTG G- 3' (17mor)

3'-TCT CGG GAC GAC C GCGC- 5' (17mor)

このようにして得られたpUKF2由来の約4.3 KbのDNA新片(約0.1 m)と5'-9ン酸化された6種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20歳のT49ガーゼ酸板被に熔かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、 大陽菌NN294 株を形質伝換し、Ap耐性体を得た。 この形質伝換機からプラスミドDNA、p U K F p r o を単離し、制限酵素消化による構造解析お よびM 13 ディデオキジ・シークエンス法による塩 基配列決定を行ったところ、pUK Fpro は目的の構

T 4 D N A リガーゼを加え、 4 ℃で18時間結合反 応を行った。

得られた超換え体プラスミドの混合物を用いて、 大器密MM294 体を形質転換し、Ap研性体を得た。 この形質転換株からプラスミドDNA pSE1UKpro 1-1Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSE1UKprol-1A は目的の構造を有す ることを確認した(第36回参照)。 参考例14.

- 1) ヒトレT c D N A を選ぶプラスミドゥレT.I の単雄:
 - (I) Luk II 細胞よりのポリ (A) RNAの類

ヒトリンパ芽球球細胞鉄しuk.Eより、チオシアン酸グアニジンー塩化リテウム法 (カサラ (Catbala)ら:ディーエヌエイ (DNA) 2.329 (1983)] に従い、ポリ (A) を有するRN Aを下記のごとく環襲した。

ヒトリンパ学球様細胞株しukg [ペリッシュ・ワイ・ルビン (Borish Y.Rubio) ら:プロ

進を有することを確認した(第35回 原)。 図 組接え体プラスミ PpSEIUKprol-IA の途点:

考例9で られたpSE1PA1-9Aプラスミド
DNA約2 成を30 MのY-0 優衝被に体かし、10
単位のKpniを加え、37でで2時間消化反応を行った。線いて1.5 Mの2M NaC1と10単位のHind回を加え、さらに37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、AFTはを用いて約6.3 KbのDNA断片を特製した。一方、上で得られたpUKFproプラスミドDNA約3 概を30 MのY-0 優衝被に体かし、15単位のKpniを加え、37でで2時間消化反応を行った。終いて1.5 Mの25 NaC1 と10単位のHind回を加え、さらに37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.55KbのDNA断片を特製した。

このようにして得られたpSEIPA1-9A由来の約 6.3 KbのDNA斯片 (約0.1 kg) とpUKPpro 由来 の1.5 5 KbのDNA断片 (約0.0 5 kg) を全量20 はのT4リガーゼ級循波におかし、100 単位の

シーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデ ミィ・オブ・サイエンス (Proc. Hatl., Acad, Sci.) USA 82. 6637 (1985)] を、5%の仔牛 胎児血清と1mM N-2-ヒドロキシェチル ピペラグンード・ー2-エタンスルフォン酸 (HEPES) ***** LORPMII 8 4 8 坊地(日本製薬社製)に、8×10°cella/alとな るように接種し、増殖させた。培養にはスピン ナー・カルチャー・ポトルを用いた。37セで 4.8時間培養した後、遠心によって知趣を集め、 10ag/mlのフォルボール・ミリステート・アセ、 テート (P.M.A : Phorbol syristate acetate) と5%の仔牛胎児血清と1mM・HEPESを 合む、新しい140RPMI1840培地に非 し、さらに37七で48時間培養した。彼いて、 この細胞部局法の一部 (250ml) から 1,100 ×g、4℃、10分間の進心によって細胞を集 め、80alのリン酸塩パッファーで洗浄した後、 5 Mチオシアン酸グアニジン。 1 O mst EDTA 。 · 50mM Tris-HC4 (pH7) および

8 % (Y/Y) 2 ーメルカプトエタノールからなる 溶放し Col中でポルテックス・ミキサーを用い 可存化した。この可溶化物を進心管に移し、4 M LiCI存在BOolを加えて提择した後、 4で、20時間砂硬した。Hitachi RPR10 ローターにて9.000 rpm. 90分間波心後、 RNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を 4 M 展集および 2 M 塩化リチウムからなる溶液 5 Gmlに整備し、Hitachi RPRIOローター にて9.000 rpm, 60分間違心後、真びRNA を沈殿として図収した。RNAの沈殿を0.1% ラウリル破棄ナトリウム、1mM EDTA。 10mMTris-HC& (pH7.5) からな る溶液 1 Colに溶解し、フェノールークロロホ ルムで抽出後、エタノール沈敦により回収した。 得られたRNA約2.5 mを10mM Tris -HCl(pH&0) および1mM EDTA からなる溶液 lelに溶かした。65℃、5分間 インキュペートじ、C. 1 alの 5 M NaClを 加えた。混合物をオリゴ (dT) セルロース・

カラム (ピー・エル・パイオケミカル (P-L Biochemical) 社製] クロマトグラフィー (カラム体質 0.5 mi) にかけた。吸着したポリ (A) を有するmRNAを10mM TrisーHCL (pH7.5) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ (A) を有するmRNA的100 成を得た。

(2) c D N A 合成と終 D N A のペクターへの様入:

オカヤマーパーグ (Okayama-Berg) の方法 〔モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロ ジィ (Mel.Cell.Biel.), 2, 161 (1982) 〕に 逆い、c DNAの合成とそれを組み込んだ組換 え体プラスミドの造成を行った。その工程の低 略を第14回に示す。

上記で期報したポリ (A) RNA約2 mg. ベクタープライマー約 L 4 mg を 5 0 mM Tris-HC 1 (pH 8.3), 8 mM Mg C 1 s. 3 0 mM KC 1, 0.3 mM DTT, 2 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTPおよ

びdCTP)および10単位のリポスクレアー ゼインヒピター (P-L Biochemicals社製) から なる溶液 2.2.3 型に溶解し、1.0単位の逆転写 酵素(生化学工業社製)を加え、41℃90分 間インキュペートし、mRNAに相補的なDN Aを合成させた。核反応物をフェノールークロ ロホルム抽出、エタノール沈繋を行い、RNA -DNA二重線の付加したペクタープライマー DNAを回収した。 欲DNAを86µM dC TPおよび0.2 miボリ (A) を合むTa T超板 液20㎡に排かし、14単位のTdT (P-L Biochemicals社製)を加えて37℃2分間イン キュペートし、cDNA3′末端に20個の (dC)値を付加した。故反応物をフェノール ータロロホルム抽出し、エタノール比較により (dC)幼の付加したcDNA-ベクタープラ イマーDNAを図収した。鉄DNAをIOmM Tris-HC & (p87.5) . 6 mM MgC &. および60mM NaCIからなる液400㎡に 宿かし、20単位の Hind回を加え、37

で2時間インキュペートし、Hind回路位で 切断した。袋反応物をフェノールークロロホル ム抽出、エタノール注取して0.5ピコモルの (dC)組付加cDNAーペクタープライマー DNAを存だ。はDNAC.2ピコモルおよび前 記のリンカーDNA 0. 4 ピコモルを 1 0 mM Tris-HC4 (pH7.5), 0.1 M NaC4 および 1 m ME DTAからなる体故 1 0 0 mに 体かし、85℃、42℃、0℃でそれぞれ10 分, 25分, 30分間インキュペートした。20 mM Tris-HC & (of 7.5) . 4 mM MgC&s. 10mM (NH4).SO4. 0.1 M KClおよび0.1ml β-NADの組成で、 全量100 減となるよう反応被を腐型した。 は反 応被に 2 5 単位の大脳 繭 D N A 5 ガーゼ (ニュ ーイングランド・バイオラブズ社製)を加え、 11で18時間インキュペートした。彼反応被 を各40 AMのdNTP. 0.15 mM B-N ADとなるよう成分を造加函数し、10単位の 大器園DNAリガーゼ、20単位の大路図DN

Aポリメラーゼ I (P-L Biochemicals社製) および I 0 単位の大路間 9 ポスクレアーゼ H (P-L Biochemicals 社製) そ加え、12 ℃、25 ℃で取及 I 時間 ずつインキュペートした。上記 反応で、c D N A そ 全む 植 換え D N A の 頭状化と、R N A ー D N A 二重額の R N A 部分が D N A に関換され、完全な二重額 D N A の 組換え体プラスミドが生成した。

CD ヒトLTcDNAを含む組換えDNAの 液炉:

図で得た組換え体プラスミドを用い、大腸密 C 6 0 0 S P 8 株 [カメロン (Cameron): プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Batl. Acad. Sci.) USA 72. 3416 (1975)] を Scottらの方法 (重定課章: 補助工学 2. 616 (1983)] に定い形質転換した。得られた約 3 0.0 0 0 個のコロニーをニトロセルロース・フィルター上に固定した。ジェネンテク (Genentech) 社が単離したヒトして C D N A [パトリック・ダブリュー

10単位を加えて、37℃で2時間切断反応を行った。次いで、NaClを検測度150mM となるように加え、制限即乗Nsil (ニューイングランド・パイオラブズ社製)10単位を加え、37℃でさらに3時間切断反応を行った。反応被からLGT法によりヒトLTDNAの大部分を含む的750bpのDNA断片(XhoI-Nsil新片)約0.3減を得た。

別に、pLT1 20度を200度のYー 50級衝波に体かし、制限酵素HacⅢ40単位を加えて、37℃で2時間切断反応を行った。 次いで、NaC & を典談皮150mMとなる

ように加え、Nsil40単位を加え、37ででさらに3時間切断反応を行った。反応能からポリアクリルアミドゲル電気飲動法により、ヒトレTのN末端部分を含む的50bpのDNA断片(Haem—Nsil斯片)約40msを存た。

一方、pGEL1 (3.4 Kb) 3 Mを全量 3 0 MのY-10 0 級価波に添かし、制限酵素 ・グレイ (Patrick M. Gray). ら:ネイチャー (Nature) 312. 721 (1984)] の5'非難収価域の一部の塩基配列と一致する 1 7 mer の合成DNA5'ーGATCCCGGCCTGCCTGCTGー3'を***Pで繊維したプローブに5 2 セで強く会合した 1 歯様を選んだ [グルンステイン・ボグネス(Grunstein Hogness) の方法、プロシーティング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72. 3961(1975)]。この歯体が持つプラスミアpLT1のcDNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス法により決定した。その結果、pLT1のcDNAはヒトLTをコードしていることが判明した。

2) 組換え体プラス i ドゥLA 1 の造成 (第37図 参照) :

前項の方法によって将たpLT1(4.7 Kb) 5 概を全量 5 0 減の Y - 0 優価液に溶かし、制 限群業 X b o II (ペーリンガーマンハイム社製)

Stule制限部業Bgllそれぞれ6単位す つを加える7℃で3時間切断反応を行った。

この反応被からしGT独によりApr 遺伝 子を含む約2.3 KbのDNA所件 (Stul -BslI版片) 約1.0 mを得た。

次に上記で得たpして1由来のXhoII—
NsiI所片(約750bp) 0.2 成および
HaeII—NsiI断片(約50bp) 2.0 ng
とpGEL1由来のStuI—Bg 4.1 断片
(約2.3 Kb) 0.8 成を全量2.0 成のT 4.9 が
ーゼ級衝波におかし、この混合権液にさらに2
単位のT 4.D N A.9 が一ゼ(空間遊社製)を加
え 4 で 1.8 時間反応を行った。

このようにして得た組換え体プラスミドDN Aを用い、Bechsrichia coli KM 4 3 0 快を コーエンらの方法により形質転換し、Aprの コロニーを得た。この形質転換技よりプラスミ ドDNAを公知の方法に従って分離特製し、放 プラスミドDNAをStul等の制限課金では 断することによりプラスミドの構造解析を行っ た。その結果、包的のプラスミドが られたことを確認した。この収換え体プラスミドモpLAIと呼ぶ。

3) LT発現プラスミドpLSA1の造成 (第38 図参照) :

前項により得られたpLA1(3.1 Kb)をもった。なり得られたpLA1の株を培養し、培養館体から常法によりpLA1のNAを顕製した。各方法によりpLA1のNAを顕製した。各方法によりpLA1のNA 3 成本 Y - 100級番波 3 でで3時間切断反応を加えるでで3時間切断反応をしているのがである。この大変の大変の大変のでは、特別の100のでは、特別の100のでは、特別の100のでは、新展のよりにで調製したpKYP1の 3 成本を記載の方法で調製したpKYP1の 3 成本を記載の方法で調整にありませてものである。このによりによりよりによりによりには、おきには、1000の大変によりによりによりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変によりには、1000の大変には、10

- (Ptrp) を含む約1.1KbのDNA斯片 (Bang-Pat [新片) 的C.B 成を た。 *t. pGEL1 (3.4Kb) 2m&Y-100 最後後20世に修かし、制限酵素Hindu. BamHlおよびPatlそれぞれも単位ずつ を加える7セで3時間切断反応を行った。この 反応波からLGT技によりリポプロテイン由来・ ターミネーターを含む的1.7 KbのDNA斯片 (PstI-BamHI版件)約0.7 点を得た。 一方、成熟ヒトレTポリペプチドのN末婦で あるしeu (CTA) から、5番目のアミノ酸 であるGiy(GGC)の2番目の塩基(GG) までと、発現に必要な開始コピン(ATG)を「 付与する必要があること、またPtrpの下後 のSD配列とATGとの距離は、6~18bp の間の適当な長さにする必要があることなどの 理由から、下記のDNAリンカーを合成した。・

まず、一本類DNA、27-merと25-merを通常のトリエステル法により合成した。27-merおよび25-merの各々20ピコモルを全量40歳のT4キナーゼ級新族に体かし、T4ポリスクレオチドキナーゼ(宝福遊社製)6単位を加えて、37でで60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpLA1由来のStulー BsaII新片(約790bp) 0.3 MLと発現ペタターpKYP18のBan度ーPstI新片(約1.1 Kb) 0.4 MLおよびpGEL1由来のPstI-BamHI断片(約1.7 Kb) 0.8 MをT49ガーゼ級新被25 Mに溶かし、この盈合液に上記DNAリンカーを約1ピコモル加えた。この混合体液にさらにT4DNA9ガーゼ8単位を加え、4でで18時間結合反応を行った。

植物之体プラスミドを含む反応混合物を用いて大腸偏RM430株を形質転換し、Aprのコロニーの培養値体からプラスミドDNAを回収した。各られたプラス

さどの構造は制限酵素EcoRI、Ban田、PstI、Hind田、BssITで切断後、
アガロースゲル電気水助により確認した。この
プラスミドをpLSA1とよぶ。pLSA1の
Ban田、Hind田付近の塩基配列は下記の
とおりであることをマキサム・ギルパートの方
法(エイ・エム・マキサム(A、M. Maxan) ら: *
プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・ア
カデミィ・オブ・サイエンス(Proc、 Nati、
Acad、Sci.)、USA 74、580(1977)] で確認した。

Bank Bied M Not Leu Pro Gly Val Gly Leu CG ATA AGC TT ATG CTA CCA GGA GTA GGC CTC

参考例15.

h G - C S F 発現プラスミドゥ C f T A l の迅 或 (第19回参照):

参考例 4 により得られた p C S P 1 - 2 D N A 2 成を全量 2 0 xtの Y - 1 0 0 級者液に体かし、制限酵素 A p a I [ペーリンガー・マンハイム (Bookringer Hannheim) 社製] と Bash I モれぞ

れ10単位を加え、37℃で4時間反応を行った。 この反応被からしGT性により15KbのDNA 繁片0.4点を複載、西収した。

一方、成熟 h G - C S F ポリペプチ P の N 末端 1 季目から 5 番目までのアミノ酸(スレオニン)(A C A または A C T)、プロリン。(C C A または C C T)、ロイシン[®](C T A)、グリシン[®](G G C)、プロリン[®](C C C)〕をコードするコドンと発現に必要な関始コドン(A T G)を付与する必要があること、また、トリプトファンプロモーター(P t r p)の下流の S D - 配列と A T G との距離を、 8~18 b p の関の適当な長さにする必要があることなどの理由から、下記の D N A リンカーを合成した。

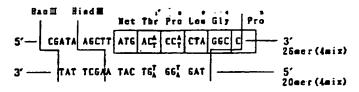
大鍋歯HB101株【ボリバー(Bolivar) ら:ツーン (Gene) 2,75 (1977)] をコーエンらの方 依 (エス・エヌ・コーエン(S.R. Cobes) ら:プロシーディング・オブ・デ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Sati. Acad. Sci.) USA. 69,2110 (1972)] により形質転換し、Aprのコロニーを発た。このコロニーの培養歯体からプラスミヤDNAを回収した。得られたプラスミヤの構造は、Ban質、Rsal、Pstl、Hind質、Bgl質で切断後、アガロースゲル電気体動により確認した。このプラスミアをPC「TAlとよぶ。PC「TAlのBan II、Hind II 付近の塩基配列は下記のとおりであることを、M13ファージを用いたディデオキシ・シータエンス法で確認した。

EGAT ALAGETT ATE ACT CCT CTA 66C CCT

考例16.

pCfBD28の造成:

(1) hG-CSFcDNAの3-字器収債域の一



まず一本値DNA、26mer と20mer を通常のト リエステル法 [アール・タレア(R. Crea) ら:プ ロシーディング・オブ・デ・ナショナル・アカデ オー・オブ・サイエンス (Proc. Nati. Acad. Sci.)、 USA 75. 5765 (1978)] により合成した。26mer、 20mer のそれぞれ 2 減をT4キナーゼ級衝波に溶 かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加 えて、37℃80分間リン酸化反応を行った。

上記で各たpCSF1-2由来のApaI-BamHI断片(1.5 Kb) 0.4 域とpLSA1由来のBang-BamHI断片(2.8 Kb) 0.2 成とを25 MのT49が一て提供液に溶かし、この混合液に上記DNA9ンカーを0.1 域加えた。この混合液にさらにT4DNA9が一て6単位を加え、4で、18時間結合反応を行った。

得られた観挫之体プラスミドの混合物を用いて

部を欠失したプラスミドpC『TB20の造成 (第40回参照):

参考例15で再られたhGICSF発現プラスミ 1 P p C f T A 1 (4.3 K b) 2 m + Y - 1 0 0 最衝波20mlに終かし、制限酵素BamHI 単位を加えて37℃4時間前化反応を行った。フ ュノールータロロホルム抽出の後、エタノール沈 歌により、DNA断片1.8 麻を図収した。このD NA斯片をクレノー級街被20㎡に体かし、dAT P. dTTP. dCTP. dGTP&enen1 MMになるように加え、さらに4単位のDNAポ リメラーゼー・タレノー断片を加えて、室温で1 時間反応させ、突出末端を平坦末端に収換した。 フェノールークロロホルム抽出後、エタノール沈 最により、DNA新片1.6点を翻収した。放DN A衛片をY-100級情故20㎡に溶かし、10 単位のECOR【モ加え、37七4時間切断反応 を行った。この反応被からLGT歩により25Kb の·DNA断片 [Bam·H [(平坦末崎) — EcoR 【新片】【紅を得た。

別に、pC(TA12 Mを20MのY-190級 循波に冷かし、10位のEcoRIを加え、37で4時間切断反応を行った後、NaCI減度が150mMとなるようにNaCIを認加し、10単位のDraIを加え、37で4時間切断反応を行った。アガロースゲル電気水助にて完全な分解を確認した後、hG-CSFcDNAを含む1.0KbのDNA新片(EcoRI-DraI所片)0.2 Mを、LGT法により特製、回収した。

上記で得たBamHI(平坦末頃)-EcoRI 断片(2.5 Kb) 0.2 MとEcoRI-DraI 片(1.0 Kb) 0.2 MをT47が一ゼ級衝波25 対に部かし、この混合液にT4DNA9が一ゼ6 単位を加え、4で18時間結合反応を行った。

得られた想接え体プラスミドの混合物を用いて 大陽歯HB101株を形質転換し、Aprのコロニーを得た。このコロニーの培養歯体よりプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドの構造は、HindⅢ、Pstlで切断後、アガロースゲル電気水助により確認した。このプラスミド

った。この反応被からLGT法により、サポプロ ナイン由来ターミネーターを含む的L7KbOD NA断片 (Pstl-BamHI断片) 約0.5 m を得た。

別に、特徴的58-110660号公報記載の方法で開催したpKYP10 3度をY-100 銀価液60点に体かし、制限酵素 Ban四(東洋紡績社製)と制限酵素Patlをそれぞれ6単位ずつ加え37でで3時間切断反応を行った。この反応液からしGT法によりトラブトファンプロモーター(Ptrp)を含む約1.1KbのDNA断片(Bang-Patl断片)約0.5度を得た。

一方、成熟b6-CSPのN末娘のアミノ酸であるThrをSer, Cys. ArsまたはGlyのうちのいずれかに整接し、発現に必要な開始コレン (ATG)を付与する必要があること、またPtrpの下便のSD配列とATGとの転離は、8~18bpの間の適当な長さにする必要があることなどの理由から、下記のDNAリンカーを合成した。

そりCITB20と呼ぶ。

CD b G - C S P の N 末端 アミノ散を配換したポ リペプチドをコードする プラスミド p C ! T L 38 の造成 (第41回 版):

参考例4の方法によって券たりCSP1-2 (4.5 Kb) 3 Mを80 MY-100 服務後に体かし、制限酵業ApaI (ベーリンガー・マンハイム社製)と制限酵業BamHIそれぞれ8単位ずつを加え、37でで3時間切断反応を行った。この反応被からLGT法によりhG-CSP遺伝子の大部分を含む的1.5 KbのBMA 断片(ApaI-BamHI断片)約0.4 Mを券た。

一方、pGEL1 (関根ら:プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA 82. 4306 (1985)] (B. coli IGEL1 PERM BP 629 の特養物から常法により採取)(3.4 Kb) 2 成モY-10 Q級価値 4 Q 成に移かし、制限酵業Hind回。BamHIおよびPatlそれぞれ4単位ずつそ加え37でで3時間切断反応を行

(4mix) Cym
Bank 26-mer Arg
Met 51y Pro Leu 61y
5'-CG ATAAGCTT ATO NGT CCA CTA GGO C-3'
3'- TATTCGAA TAC NCA 66T GAT -5'
20-mer (4mix)

(NはC, A. TをたはCのいずれかの塩基である) まず、一本類DNA、28-mer と20-mer を選索のトリエステル法により合成した。28mer および20-mer の各々20ピコモルを40 MのT4中ナーゼ製質液に溶かし、T4ポリスタ レオチドキナーゼ6単位を加えて、37℃で60 分切りン酸化反応を行った。

次に上記で得たpCSF1-2由来のApaI
-BamHI新片(約1.5 kb) 0.3 MとpGEL1
由来のPst1-BamHI新片(約1.7 kb)
0.2 Mおよび発現ペクターpKYP10のBan回
-PstI新片(約1.1 kb) 0.2 Mを全量3 0
MのT4リガーゼ製造液に溶かし、この混合液に
上記DNAリガーゼ製造液に溶かし、この混合液に
上記DNAリガーゼを加
えて4で、18時間結合反応を行った。

超換え体プラスミヤを含む反応混合物を用いて 大器間C 8 0 0 S P 8 (PERM BP-1078) 【カメロン (Cameron) ら:プロシーディング・オ ブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエ ンス (Proc. Ratl. Acad. Sci.)。USA 72、3416 (1975) 】を形質転換し、Apr のコロニーを得 た。この形質転換株よりプラスミヤDNAを公知 の方法に従って分離・構製した。 波プラスミドD NAの構造はPstl. EcoRI, Ban 型で 切断後、ポリアタリルアミドゲル電気体動により 確認した。このプラスミドを第41箇に示したとお りpC!TL38とよぶ。上記プラスミド中のhG ーCSF 誘導体遺伝子のN支端付近の配列は

Ret Ser Pro Leu Gly Pro Ala pCfTL38-ATG AGT CCA CTA GGC CCT GCC であることをM 1 3 ファージを用いたディアオキ シ・シータエンス後により確認した。

図 無独之体プラスミドpC(WD1の造成(第 42回参照):

参考例15の方法で得たpCfTA1 5 概を 50㎡のY-100級新液に溶かし、制限療力StuI

dCTP. dGTP&then100 mMC4 るように加え、DNAポリメラーゼI・クレノ 一断片を2単位加え17℃で15分間反応を行 った。 6 8 ℃で10分間処理してDNAボリメラ ーゼ【・タレノー新片を失信させた後、NaCI を190mgとなるように加え、耐限酵素Pat I ・七5単位加える7℃で1時間消化反応を行った。 反応被からLGT法によりLppターモネータ ーを含む的L 8 K b のDN A 断片【B a m H I】 (平坦末端) - P s t [断片] 約0.8 度を得た。 これとは別に、pGEL1の4度を40点のY -100最新被に体かし、制限企業日本元章 (東洋教験社製) 10単位とPatl 10単 位を加える7℃で1時間消化反応を行い、反応 彼から、LGT抜でトリプトファン基プロモー ターを合む的 1 KbのDNA断片(Ban 五一 Patl所片) をC4成得た。

上記で得た。PCITAI由来のBang一 Stul版片 (約1.3 Kb) 約0.2 mg。 PKYP 26由来のBang I (平坦東線) -- Pati 10 位と、制限課業Ban可(東洋紡績社製)
10単位を加えて、37℃で1時間落化反応を行った。反応被からしGT性によりh6-CSPc
DNAを含む約L3KhのDNA斯片(Ban可
-Stul新片)約0.5 成を得た。例に、参考例2の方法で製造したpKYP26 3 成を50
成のY-100級衝波に移かし、BamH1
6 単位を加えて、30℃で1時間消化反応を行った。

これに10mM Tris-HCI(pH7.5)。
1 ml EDTAで飽和したフェノールを等量加え、激しく復辞した後、低速遠心分離法(3,300 rps 、10分間、以下同条件)により水層を築めた。等量のタロロネルムを加え、激しく復辞した後低遠遠心分離法により水層を集めた。1 /10 9 0 3 Mm酸ナトリウムを加え、2.5 倍等のエタノールを加え、-2 0 で、1時間静度した。冷却遠心分離法(4 で、11,0 0 0 rps 10分間)で沈澱を集めた。この沈澱を3 0 成のタレノー複衝液に体かし、dATP。dTTP.

断片(約1.8 Kb) 約0.1 Mc. pGEL1由来のBan質-Psti断片(約1 Kb)約0.1 Mc 3 0 Mc T 4 DNA リガーゼ級衝放に絡かし、4 単位のT 4 DNA リガーゼを加え、4 た。18時間結合反応を行った。

技反応放を用いて大陽酸HB101株を形質 転換し、Aprのコロニーを得、このコロニー より軌能パーンポイムらの方法によりプラスミ PDNAを回収し、第42回に示したpC(WD) を存た。

(4) pCfT95K19の政政(第43回参照) pCfTL38の5 Mを50 MのY-100 銀新被に移かし、制限非常Hind回とBg L 国を10単位ずつ加え、37でで1時間情化反応を行った。反応被からLGT技によりトリプトファン・プロモーターを含む約2.6 KbのDNA所片(Hind回-Bg L 国所片)約0.7 Mを得た。別にpCfTL38。100 Mを1.5 mlのY-100銀術故に移かし、観覧非常BamHlとHind回を80位ずつ加え、37でで

特開平 2-227075 (61)

6 時間側化反応を行った。反応被からしGT生によりb6-CSPcDNAを含むDNA所件を 回収し、ELUTIPTE-d (Schleicher & Schuell 社製) で構製した。このDNA所件を 3 0 MのY-1 5 0 最新被に体かし、制限課業 DpnI (Noehringer Namaheim社製) 3 単位 を加え37でで15分間消化反応を行った。反応被 からボリアクリルアはド電気放動法で、hG-CSPcDNAを含む的3 0 0 bpのDNA新片 (HindE-DpnI新片)的1 概を得た。

別にPCITB20の10点を100点のYー100最後に添かし、割限群業Avall0単位を加え、37℃で1時間積化反応を行った。フェノールータロロホルム抽出およびエタノール拡張でDNAを超収し、30㎡のタレノー級後に添かし、DNAボリメラーゼI・タレノー新片を2単位加え、17℃で30分間反応を行った。88℃で10分間処理しDNAボリメラーゼI・タレノー新片を失替させ、NaClを100mMになるように加え割限企業Bglu

(東洋紡被社製)7単位とBgま『(日本ジーン社製)2単位を加え、37℃で1時間消化反応を行った。反応被からLGT法によりトリプトファン・プロモーター部分を含む約1KbのDNA断片(Bang-Bgま『新片)約0.8 によりアクーミネーター部分を含む約1.8 KbのDNA断片(Bgま『-Bgま』新片)約1歳を得た。

これとは別に15度のpCIT95K19を 150点のY-100種類後に移かし、創限課 書Bs & I (日本ジーン社製) 8単位とSau 3AI 10単位を加え37セで1時間前化反応 を行った。反応核からポリアクリルアミドゲル 電気水助後によりhG-CSPcDNA部分を 含む約350 bpのDNA断片(Bs & I-Sau 3AI 新片)的0.3減を得た。

これとは別に、下記のONA リンカーを合成した。

10単位を加え37℃で1時間核化反応を行った。 反応被からLGT後でよりpターミネーター起 分を含む約480bpのDNA断片[Aval (平坦末端)-Bs&I]約0.3 減を得た。

上記で呼た、pCfTL38由来のHind 面一Bsllmh(約2.6Kb)的0.1 点。 pCfTL38由来のHind面一Dpnlm 片(約300bp)的0.2 点。pCfTB20由 来のAval(平坦末端)一Bsllmh(約 480bp)的0.15 点を30点のT4DNA リガーゼ級衝波に排かし、4単位のT4DNA リガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。彼反応被を用いて大路曲HB101技を 形質転換し、Aprのコロニーを得、このコロニーより的配パーンポイムらの方法によりプラスミアDNAを回収し、第43回に示したpCf T95K19を得た。

(5) pCfAAlの遊成(第43図参照): 前項で得たpCfT95K19 5点を50 減のY-100級衝波に溶かし、射限酵素BanⅢ

Bank 39mer(Zmix) The I Sau3A I

Met Thr Pro Leu Gly Pro Amn Ser Ser

5'- CGATAAGCTT ATG ACA CCA CTG SEC CCA AACITCG AGT CT -3'
3'- TATTCGAA TAC TET SET SEA CCE SET TTG AGC TCA GACTAG 5'

41mer(Zmix)

まず、一本類 DNA、39 -mer と41 -mer を通常のトリエステル法により合成した。39 -mer および41-mer の各々20ピコモルを全量40㎡のT4キナーゼ級価値に溶かし、T4ポリスクレオチドキナーゼ(空間遊社製)6単位を加えて、37でで80分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpC「T95KI9由来のBangーBs&[断片(約IKb)0.1点。Bs&IーBs&I断片(約1Kb)0.05点。Bs&IーBs&I断片(約18Kb)0.05点。Bs&IーSau3AI断片(約350bp)0.1点をT4DNAリガーを表析液25点に排かし、この混合液に上記DNAリンカーを約2ピコモル加えた。さらにT4DNAリガーを6単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。減反応液を用いて大腸歯HB101株を形質伝換し、Ap*のコロニーを将、このコロニー

より前紀パーンポイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43回に示したPC(AA1を得た。前紀ディデオキシ・シータエンス接でPC「AA1のDNAリンカー部分の塩基配料を決定したところ、4番目のアミノ酸である。したところ、4番目のアミノ酸であることが判別した。このPC(AA1ではAG-CSFの10番目のProから23番目のしずまでの14アミノ酸をコードするDNA部分が欠失している。また、hG-CSPの8番目のA1aがAsnに変化する変異が導入されており、新たにXho「サイトが生じる。

60 pCfAB5の遊成(第43団参照):

前項で得た P C 「 A A 1 3 成を 3 0 成の Y - 1 0 0 級 後後 液に 体かし、 制限 酵素 X h o I を 5 単位 加え、 37 でで 1 時間 消化 反応を行った。 ア が P ー ス ゲル電 気 泳動 法 で X h o I 切断 が 完全に 行われていることを 破越したのち、 制度 森 B s I I (日本 グーン 社製)を 1 単位 加え、 37 で で 25 分間 部分 消化 反応を 行った。 反応 液 か

と2.5 - mer および2.5 - merと2.3 - mer の DNA20ピコモルずつを各々全量40歳のT4キナーゼ級衝波に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(空流通社製)6単位を加えて、37でで6.0分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpC(AAl由来のXholle)のLink、的項で得たpC(T)をKi9由来のBs Alle)のLinkではない。 からである Bs Alle)のLinkではない。 断片(約350 bp)のLinkでT4DNAリガー で提供後30Mに溶かし、この混合液に上記DNAリンカーを2ピコモルずつ加えた。さらにT 4DNAリガーゼ8単位を加え、4でで18時 間給合反応を行った。

放反応被を用いて大阪歯HB101株を形質 転換し、Ap゚のコロニーを得、このコロニーより前記パーンポイムらの方法によりプラスミドDNAを囲収し、第43回に示したpCfAB5を得た。前記ディデオキシ・シータエンス 法でpCfAB5のDNA リンカー部分の塩基配列を決定したところ、17番目のアミノ 世をコ

らしGT供によりトリプトファン・プロモータ 一部分および&ppターミネーター部分を含む 約3 kbのDNA断片(X b o I ーBg & I 断片) 約1 減を得た。これとは別に、下記のDNAリ ンカーを合成した。

Ibo I
Ser Ser Lee Pro Gla Ser Phe Lee
TCS AGT CTA CCA CAG AGC TTC CT
LCA GAT GGT GTC TCG AAG GAAAATTT

23mer 25mer

(Ser 61y

Leu Lys Arg Leu Glu Gla Va! Arg Lya

TTTA AAA NGC TTA GAG CAA STG AGG AA 27mer(4mix)

T NCG AAT CTC GTT CAC TCC TTCTAG 25mer(4mix)

(NtG.A.TictC)

このリンカーDNAはPCIAAIのhGー CSFcDNAで欠失していたhGーCSFの 10番目のProから23番目のLysまでの 14アミノ酸をコードするDNA部分を含んでいる。

まず、一本領DNA、27-mer と25-mer (2種)と23-mer を通常のトリエステル法 により合成した。たがいに相様的な27-mer

ードするコドンの1番目の塩基はpCIAB5ではAであり、成熟型bG-CSFの17番目のCysが、pCIAB5ではSerに置接していることが判明した。

(7) pCfBA8の造成(第44回参照):

前項で得たりCIABS、3点を40点のY-100提衝波に排かし、制限酵素AvaIS単位とBs&IS単位を加え37でで1時間消化反応を行った。反応液からしGT法により、トリプトファンプロモーター部分と1ppター
ミネーター部分を含む約28kbのDNA断片
(AvaI-Bs&II断片)を約1点等た。

これとは別に、PC(WD)の8 成を50点の Y-100級新被に体かし、制限酵素Bs fl を5単位加え、37℃で1時間情化反応を行っ た。アガロースゲル電気体動法でBs fl 切断 が完全に行われていることを確認した後に、制 職群素Avalを3単位加え、37℃で20分間部 分切断反応を行った。反応液からLGT法によ り、bG-CSPcDNAの大部分を含む的

特開平 2-227075 (63)

1.3 KbのDNA断片 (Bell-Aval断片) を0.4 成得た。

次に上記で得たpCfAB5由来のAvaI -BglI断片(約28Kb)のQ1元とpCf WD1由来のBglI-AvaI断片(約1.3 Kb) Q3両をT4DNAリガーゼ級衝被25点 に溶かし、3単位のT4DNAリガーゼを加え、 4で18時間結合反応を行った。

被反応被を用いて大腸歯HB101件を形質 伝換し、Aprのコロニーを得、このコロニー より前記パーンポイムらの方法によりプラスミ PDNAを回収し、第44間に示したpC「BA 8を得た。

pCfBA8のコードするれG-CSF誘導体のアミノ酸配列は、成熟型カG-CSFの6 番目のAlaがAsnに、17番目のCyaが Serに関接している。

(9) p C f B D 28の造成(第44回参照): まず、下記のD N A リンカーを合成した。

大にpCfBA8由来のBanII-Bg LI 斯 片(約2.7 K b 斯片) 0.1 M 、同じくpCfBA 8由来のXhol-Bg LI 斯片(約1.4 K b 斯片) 0.1 MをT 4 D N A 9 ガーゼ級衝滅2.5 Mに溶かし、この混合液に上記D N A 9 ンカー を約2 ピコモル加えた。さらにT 4 D N A 9 ガ ーゼ8単位を加え、4 セで1.8 時間結合反応を 行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大陽簡HB101株を形質伝換し、Aprのコロニーを存在。このコロニーの培養値体からプラスミドを回収し、pC!BD28を得た。前紀ディデオキシ・シータエンス法でDNAリンカー部分の塩基配列を決定したところ、hGーCSF研算体のN末傾倒の塩基配列は下記の通りであることが判明した。

-C#902#

1

Mot Ala Pro Thr Tyr Ara Ala ATG GCA CCA ACA TAT CGC GCC

pCIBD28がコードするNG-CSF原導体は、それぞれ成集型 NG-CSFに比べて次

Ban II Not Ala Pro (4) (4) (4) (4)

5'- CGATAAGCTT ATG GCA CCA HCA HAT NGC GHC -3'

3'- TATTCGAA TAC CGT GGT HGT HTA NCG CNG AGCT-5'

33mer (255mix) (XはG, A. T. C のいづれかーつ)

このDNAリンカーは、4ケ所の塩基がG. A. T. Cのうちのいづれかであり、合計258種類のDNAリンカーの混合物として得られる。その結果、このDNAリンカーのコードするhGーCSFのN末崎のアミノ酸配列としては4ヶ所に4種類のアミノ酸の可能性があり、全体として258種類のアミノ酸配列が可能であるようにデザインされている。

まず一本線DNA、31-merと33-mer を通常のトリエステル法により合成した。31 -merおよび33-merの各々2 概を全量 40減のT4+ナーゼ級賃後にとかし、T4ポリ メクレオチドキナーゼ30単位(宝箔造社製) を加えて、37でで60分間リン酸化反応を行った。

のようにアミノ酸漿器が置換されている。

アミノ敦献後の位置。	プラスミド
(he-CSP の 7t/酸)	pCf8028
1 書音 (Thr)	Ala
, 3番目 (Leu)	Thr
4 春日 (Gly)	Туг
5 書自 (Pro)	Arg
17番目 (Cys)	Ser

pCfBD28にコードされるhで一CSF語 事体をhG-CSF(ND28)と呼ぶ。 pCfBD28を含む大勝鶴機体は Bucherichia coliECfBD28(PERMBP-1479) として数工研に答託してある。

参考例1.7% 2.7%

組換え体プラスミドpTkSR18の造成:
 (1) 組換え体プラスミドpTkSJ1の遊成:
 参考例8で得られたpTA4プラスミドDNA約2減を30点のY-0。製造液に溶かし、
 10単位のEcoRIと30単位のBbelを

特爾平 2-227075 (64)

加え、37℃で2時間消化反応を行った。65 で、18分間の熱処理機、APT法を用い、約 2.8 KbのBbeI-EcoRI解片を模製した。 別に、pTA4DNA約3点を30点のY-0 装着被に添かし、12単位のKpn I を加え 37℃で2時間第化反応を行った。確いて、 1.5mの2M NaCdと1単位のEcoRI を加え、さらに37℃で1時間消化反応を行っ た。この反応により、DNAはKpnlで完全 に、EcoRIで部分的に消化された。 65℃、 10分間の熱処理後、AFT法を用い、約1.4 KbのEcoRI-KpnI断片を精製した。ま た、下記2種の合成DNA(16塩基と24塩 革)をアプライド・パイオシステムズ社380 A·DNA合成機を用いて合成し、それぞれ別 々に上で述べた方法と同様の方法を用いて5'ー リン酸化した。

5'-CTCCTGCCTCCCATGG-3' 3'-CGCGGAGGACGGAGGGTACCTTAA-5' このようにして得られたpTA4由来の約2.8

10分間の熱処理後、APT法を用い、約0.5 KBのDNA断片を精製した。別に、参考例5-口で得られたpTrS33プラスもドDNA約 2 m を 1 5 0 m M K C & を含む Y - 0 経療液 に排かし、8単位のPvulと15単位のSal 1を加え、37℃で2時間消化反応を行った。 65℃、10分間の熟処理後、APT法を用い、 約LOKBのDNA断片を精製した。また、名名 例BであられたpTerm2プラスミドDNA 約2点を30点のY-150級指放に体かし、 8単位のPvulと8単位のNsil (How Bogland Biolabe 社製) を加え、37℃で2時 関補化反応を行った。 65℃、10分間の熱処 理读、APT法を用い、約1.85%bのDNA新 片を構製した。また、下記2種の合成DNA (35塩基と31塩基) モアプライド・パイオ システムズ社380A・DNA合成機を用いて 合成し、それぞれを別々に上で述べた方法と問 様の方法を足いてジーリン量化した。

KbのBbel-EcaR「新片(約0.1元)、 pTA4由来の約1.4 KbのEcaRl-Kpn! 断片(約0.05元) および5'-リン酸化された 2種の合成DNA(それぞれ1 paole ずつ)を 20点のT4リガーゼ優衝波に停かし、50単 位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時 脚結合度応を行った。

得られた想換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸歯MM294体を形質転換し、Ap附性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSJ1を早離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シータエンス法により、pTkSJ1が目的の構造を有することを確認した(第50回参照)。

5' — ACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA — 3' 3' — TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTT — 5'

このようにして得られたpTkSJl由来の約0.5 KbのXhoIーScaI新片(約0.05 Mp)、pTrS33由来の約1.0 KbのPvuIーSalI新片(約0.1 mg)、pTerm2由来の約1.8 5 KbのNsiIーPvuI新片(約0.1 mg)、および5'ーリン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmole ずつ)を20 mのT4リガーゼ級衝換に熔かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

このようにして得られた無換え体プラスミドの混合物を用いて、大鍋棚MM294株を形式 転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSR18年単離し、 新限弊素剤化による構造解析およびM13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス決により、pTkSR18が目的の構造を有することを確認した(第51間 照)。

考例18

pTKSS4の強度:

(1) 無後え体プラス t ドゥTkSD217の設成:

参考例 8 で得られたりTA4プラスミドDN A 約10点をI00点のY-100級指摘に 潜かし、約30単位のXholを加え、37℃ で2時間消化反応を行った。続いて、フェノー ル拍出およびクロロネルム抽出を行った後、ェ タノール沈澱によってDNA新片を四収し、 5 0 MのTE級指統 [10mM Tris-HC! (pH7.5)、0.5 mM EDTA] に体かした。 このDNA排液10点に、5倍濃度のBAL31 級衡波[100mM Tris-HC&(pH 8.6) . 3M NaC#, 80mM CaC#, 80mM MaC4. . 5mM EDTA] & 10㎡、水を30㎡加え、さらに0.5単位のエキ ソスクレアーゼBAL31(宝河路社場)を加え。 30℃で5分間反応を行った。この反応条件は、 X h o l 末端から約0.5 KbのDNAが割れる条件

「突出来報を削って平坦宋雄に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、タロロホルム抽出を行った後、エタノール沈酸によってDNA断片を 回収した。このDNA断片を30 MのY-100 級衝波に移かし、10単位のBamHIを加え、 37でで2時間消化反応を行った。65で、10 分間の熱処理後、APT法を用い、約2.8 KbのD NA断片を精製した。

このようにして得られたpTA4由来の約1.5 KbのDNA所片(約0.2 m)とpTrS33由来の約2.8 KbのDNA断片(約0.1 m)とそ、全量20mのT45が一て優勝被に体かし、50単位のT4DNA5が一てを加え、4でで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの是合物を用いて、 大陽関MM284株を形質伝換し、Ap耐性体を 得た。この形質伝検体からプラスミドDNApT kSD217を単離し、制限酵素液化による構造 解析を行うとともに、大腸質トリプトファン・プロモーター(Ptrp)の下板の地温配列をM である。この反応をフェノール抽出によって止め、 さらにクロロホルム抽出を行った後、エタノール 沈設により DNA 新片を図収した。この DNA 新 片を30 Mの Y-100 機管液に溶かし、10 単 位の Bam H I を加え、37 でで2時間消化反応 を行った。85 で、10分間の絶処理後、AFT 法を用い、約1.5 Kbの DNA 新片を精製した。

これとは別に、pTrS33プラスミドDNA (参考例5) 約2 & そ30 & のY-0 録価液中で約12単位のSaclを加え、37 でで2 時間消化反応を行った。フェノール抽出とタロロホルム抽出の後、エタノール状態によってDNA 断片を圏収し、全量40 & の50 mM TrisーHC & (pH7.8)、7 mM MgC & 。、6 mM 2ーメルカプトエタノール、0.25 mM dATP 0.25 mM dCTP に25 mM d

13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス (dideaxy sequence) 技によって決定した。その結果、pTk5D217は目的の構造を有しており、かつ放集基配列は

Cial Hindm 179 180 181 182

Met Amp Cym Tyr Pha

--- AT CGATA-AGCTT ATG GAC, TGC TAC TTT ---

であることを確認した(第52回参照)。 ② 経換え体プラスミドゥTkSL11の盗成:

上で得られたりTkSD217プラスミドDNA約3 成を30 成のY-100級衝液に溶かし、10単位のHind面と15単位のScale加え、37 でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約0.23 KbのDNA所件を精製した。次に、参考例5で得られたりTerm2プラスミドDNA約2 成を30 成のY-100級衝液に添かし、10単位のHind面と10単位のNeil (ニュー・イングランド・パイオラブズ社製)を加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の熱処理後、AFT法を用い、

約2.8 Kbの D N A 断片を領観した。また、下記 2 種の合成 D N A (3.5 塩基と3.1 塩基)をア プライド・ペイオンステムズ社3.8 G A - D N A 合成銀を用いて合成し、それぞれ別々に上で 述べた方法を用いて5′- リン酸化した。

5'-ACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA -3'
3'-TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTT -5'
このようにして得られたpTkSD217由来
の約0.23KbのDNA断片(約0.01㎡)、
pTerm2由来の約2.8KbのDNA断片(約0.01㎡)、
pTerm2由来の約2.8KbのDNA断片(約0.1㎡)、および5'-リン酸化された2種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20㎡のT4リガーゼ級衝放に溶かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4で18時間結合反応を行った。

母られた観接え体プラスミドの混合物を用いて、大器館MM294株を形質伝接し、Ap耐性株を得た。この形質伝接株からプラスミドDNA、pTkSL11を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディデオキシ・シ

得られた組換え体プラスミアの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質伝換し、Apmi 性体を得た。この形質転換体からプラスミアD NA、pTkSS4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pTkSS4が、 目的の構造を有することを確認した(第54回 参照)。

参考例19.

組換えブラスミドpTG3の遊成:

参考例 18で得られた p T k S S 4 プラスミド D N A 的 2 減を3 0 減の Y - 0 級衝液に協かし、1 0 単位の網関酵業 N a r I (ニューイングランド・パイオラブズ社製)を加え、3 7 でで2時間清化反応を行った。続いて1.0 減の2 M Na C L と 1 2 単位のB a m H I を加え、さらに3 7 でで2 時間消化反応を行った。6 5 で、1 0 分間の無処理後、A F T 法を用いて約3.3 Kbの D N A 断片を特質した。一方、参考例1 7 で得られた p T k S R 1 8 プラスミド D N A 的3 減を上と同一の反応に供し、6 5 で、

ークエンス法による塩基配列決定を行ったところ、pTkSL11は目的の構造を有することを確認した(第53図 限)。

(3) 紙換えプラスミドpTkSS4の造成:

参考例1で得られたptPA7プラスミドDNA約2 減を30 減のY-100 優価旅に溶かし、12単位の制限酵素Scalを加え、37でで2時間消化反応を行った。65で、10分間の無処理後、AFT法を用いて約2.0 KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpTkSL11プラスミドDNA約2減を上と同様の反応に供し、65で、10分間の無処理後、APT法を用いて約2.0 KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたptPA7由来の約 2.0 KbのDNA断片(約0.1 mm)とpTkSL 1.1 由来の約2.0 KbのDNA断片(約0.1 mm) を2.0 mtのT4リガーゼ観告被に溶かし、T4 DNAリガーゼ3.0 0単位を加え、4 でで1.8 時間結合反応を行った。

1 0 分間の熱処理後、A P T 法を用いて約 0.2 Kbの D N A 断片を精製した。

このようにして得られたpTkSS4由来の 約3.3 KbのDNA断片 (約0.1 mm) とpTkS R18由来の約0.2 KbのDNA断片 (約0.0 I ms) を20 mのT4 リガーゼ級衝波に修かし、 T4DNAリガーゼ100単位を加え、4 でで 18時間結合反応を行った。

得られた無換え体プラスミドの混合物を用いて、大阪館MM294株を形質伝換し、Ap對性株を得た。この形質伝換株からプラスミドDNA、pTG3を単離し、制限群業消化による構造解析を行ったところ、pTG3が目的の構造を有することを確認した(第5.5 図参照)。 参考例20.

紅独えプラスミドpbPA2の造成:

参考例19で得られたpTG3プラスミドDNA約2 REY-100級衝板30 REP vul を加え、37で2時間消化反応を行った。65で、10分

特開平2-227075 (67)

間の急処理後、ATF供を用いて的し7Kbの DNA断片を特製した。

また、 考例12で得られたpUKB101 プラスミドDNA的2 MをY-I00級情報30 Mに移かし、10単位のNcoIとPvuIを 加え、37でで2時間別化反応を行った。65 で、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約 3.0%のDNA所片を発彰した。

さらに、参考例17で得られたpTkSR18 プラスミドDNA約2 MをY-100級新練30 Mに移かし、10単位のHind回とAatI を加え、37セで2時間前化反応を行った。 85セ、10分間の熱処環後、ATF法を用い で約0.55 KbのDNA脈片を積製した。

また、下記4種の合成DNA (37塩基と41 塩基および41塩基と45塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

て、大器館MM 2 9 4 株を形質転換し、 A.p 耐性技を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、phPA 2 を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13 ディアオキシ・シークエンス扱による塩基配列決定を行ったところ、phPA 2 は目的の構造を有することを確認した(第 5 .6 図参照)。

発明の効果

本発明によればプロテアーゼ抵抗性、熱安定性 などの性質を付与したポリペプチドが抵換えDNA 住住により工業的に保給される。

4. 図面の簡単な説明

Puc: フコース

第1回は、Nーグリコシド給合型物類の分類を エナ

G l c : グルコース、M a n : マンノース、 G l c N A c : N ー アセチルグルコサミン、

Gal:ガラクトース、Sia:シアル酸、

第2回は、リピド中間 の構造を示す。

5'— CCCCAGCTETTCTGAAGGAAATAGTGACTGCTATGAG — 3' (3 7 年基)
3'—TGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTTATCACTGACGATACTC — 5' (4 1 年集)

5'— GGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC — 3' (41)

これらの合成DNAを20ピコモル (pmoles) ずつ頃々に、20世のT4キナーゼ級仮故中で 5単位のT4DNAキナーゼ (宝福遊社製)を 加え、37でで30分間反応させることにより、 合成DNAの5′支援をリン酸化した。

このようにして得られたpTG3由来の約1.7 KbのDNA断片(約0.05 元)、pUKB101由来の約3.0 KbのDNA断片(約0.05 元)、pUKB101由来の約3.0 KbのDNA断片(約0.05 KbのDNA断片(約0.05 KbのDNA断片(約0.05 元)、および5'リン酸化された4種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20㎡のT4リガーゼ優衡液に溶かし300単位のT4リガーゼを加え、4でで18時間結合反応を行った。

得られた抵抗之体プラスミドの混合物を用い

団中PPはピロリン酸を示す。

第3回は、ドリコールリン酸サイタルを示す。 図中記号はそれぞれ下記物質を示す。

P~~ : ドリコール酸、P-P ~~ : ドリコールピロリン酸、GDP:グアニジン二リン酸、 UDP:ウリジンニリン酸、◆:グルコース、 マ:マンノース、●:N-アセチルグルコサミン

第4回は、N-グリコシア結合型等額の生合成系を示す。

国中記号はそれぞれ下記物質を示す。

■:Nーアセチルグルコサミン、〇:マンノース、 ●:ガラクトース、◆:シアル酸、▲:グルコー ス、△:フコース

第5回は、プラスミドゥAS28の造成工程を 示す。

第8回はプラスミドゥASN6の造成工程を示す。

第7図(1)図はプラスミドpt198028C#145 の遊成 工程を示す。

第1箇20はプラスミドpASN145の造成工

程を示す。

第800回は、大量面で生産、精製したれら一C SPおよびれGーCSP(ND28)とCHO細 地で生産させたれGーCSP、れGーCSP(N D28)、れGーCSP(ND28N6)および れGーCSP(ND28N145)をSDSーポ オアクリルアミド電気体動に供した後、無染色し たものである。

第8 図面は、第8 回園に示したゲル上の接白質 をニトロセルロース裏に参した後、抗 h G ー C S P 単クローン抗体を用いて酵素抗体染色を行った ものである。

第8四回は、第8回回の模式団である。

第8何函は、AG-CSP [ND28] について、O-グリコシド結合型雑組が新たに付加したものと、そうでないものについてキモトリプシン 抵抗性を調べたときのSDS-ポリアクリルアミ ドゲル電気水助の結果とその模式図を示す。

第8四回は、hG-CSP(ND28N8)について、N-グリコンド結合型精剤が新たに付加

したものと、そうでないものについてキモトリプ シン抵抗性を関べたときのSDS-ポリアクリル アミドゲル電気拡動の結果とその模式団を示す。

第8回回は、トG-CSP(ND28N145) について、ローグリコシド結合型管摘あるいはN ーグリコシド結合型管摘が新たに付加したものと そうでないものについてキモトリプシン抵抗性を 調べたときのSDS-ボリアタリルアミドゲル電 気体験の結果とその信式間を示す。

第8の団は、hG-CSP[ND28N6]についてN-グリコシド結合型糖増が新たに付加したものと、それを除去したものについて熱安定性を比較したものである。 O印はN-グリカナーゼ 処理(N-グリコシド結合型糖増付加hG-CSF[ND28N8]を示す。

第9四は1本編pUKmpS1の改成工程を示す。

第10回はプラスミドゥびKS1の造成工程を

示す。

第11回はプラスミドゥSE1UKSi-1d の函数工程を示す。

第12回は天然型pro-UKとUK碼導体 UK-SIのトロンピン感受性を比較したSDS ーポリアタリルアミドゲル電気状動の結果を示す。

第13回は天然型proーUKとUK病体体 UK-Slのトロンピン感受性をアミドリティック活性で比較した結果を示すグラフである。

第14回(U)と切は、オカヤマ・パーダ法による c DNA合成と放DNAを含む超換え体プラスも Yの遊成工程を示す。

第15回はプラスミドpCCK1の登成工程を 示す。

第18間はプラスミドゥCCK2の造成工程を 示す。

第17回はヒトpro-UKcDNAを運ぶプラスもドpUKllの遊成工程を示す。

第18型はプラスミドpTrS20の造成工程 を示す。 第19回はプラスミドゥTァS33の遊成工程 を示す。

第20回はプラスミドpTerm2の造成工程を示す。

第21回はプラスミドpTSP10の造成工程を示す。

第22回はプラスミドゥTA4の造成工程を示す。

第23面はプラスでドゥAGE105Mの遊成 工程を示す。

第24回はプラスミドpAGE106の造成工程を示す。

第25日はプラスミドゥSE1PA1〜5の登 成工程を示す。

第26回はプラスもドゥSE1PA1-9の造成工程を栄す。

第27回はプラスミドpUC19Hの造成工程を示す。

第28回はプラスミドpSE1PAI-8A の遊立工程を示す。

特開平2-227075 (69)

第29回はプラスミドpSE1PALSE1dbfr1-9Aの連 はて発表ラナ

第30回はプラスミドゥSE1GC3-3の改 成工規を示す。

第31型はプラスミドpAS3-3の遊成工程を 示す。

第32面はプラスミドp U K A 2 の過点工程を 示す。

第33回はプラスミドpUKB101の遊応工程を示す。

第34回はプラスミソpUKF2の遊成工程を 示す。

第35回はプラスミドpUKFproの遊成工程を示す。

第38回はプラスミドpSElUKprollAの遊成工程を示す。

第37回はプラスミドゥLA1の造成工程を示す。

第38回はプラスミドpLSA1の造成工程を 示す。

录す。

第48回はプラスミドゥSEUKS3の過点工程を受す。

第49回は天然型pro-UKおよび糖飲付加型作飾UK-S3の70でにおける熱失活曲線を 示す。

第50回はプラスミドpTkSJlの遊成工程 を示す。

第51回はプラスミドゥTkSR18の遊成工 数を示す。

第52回はプラスミドpTkSD217の造成 工程を示す。

第53回はプラスミドpTkSL11の造成工 作を示す。

第54回はプラスミドpTkSS4の遊成工程を示す。

第55回はプラスミドpTG3の遊成工程を示

第56団はプラスミドゥhPA2の造成工程を 示す。 第39団はプラスミドゥCITA1の造成工程 キネナ

第40回はプラスミドpCfTB20の造成工程を示す。

第41回はプラスミドpCfTL38の過点工程を示す。

第42回はプラスミドゥCfWD1の遊成工程 キ分す。

第43団はプラスミドpCIT95K19、 pCIAA1およびpCIA85の遊成工程を示す。

第44回はプラスミドゥC「BA8および pC「BD28の遊成工程を示す。

第45回は天然型 pro-UKおよび語彙付加型作飾 UK-Slの特装住入時における全身線容 基因子のレベルの時間的変化を示す。

第46 図は天然型 pro-UKおよび額額付加型修飾UK-S1の急速静注時における全身維格 基因子のレベルの時間的変化を示す。

第47図のプラスミドpUKS3の造成工程を

Man 41.6

Man 41.6

Man 41.3

Man 61.4

Man 61.4

Man 61.3

Glc 41.2

Glc 41.3

Glc 41.3

Man 61.3

Man 61.3

Man 71.3

Man 71.3

SZI

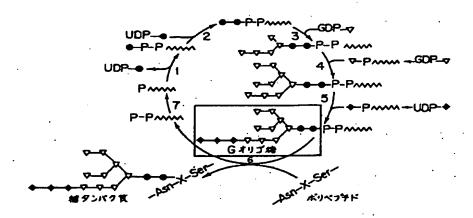
無

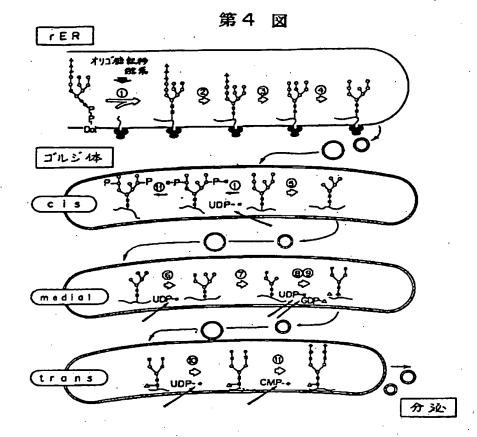
第 1 図

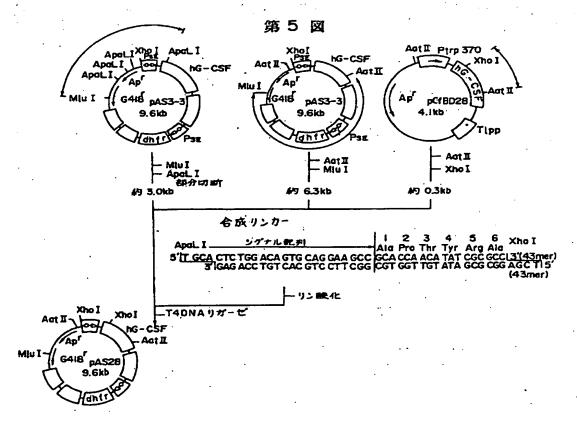
高マントス型 :(代表切!)

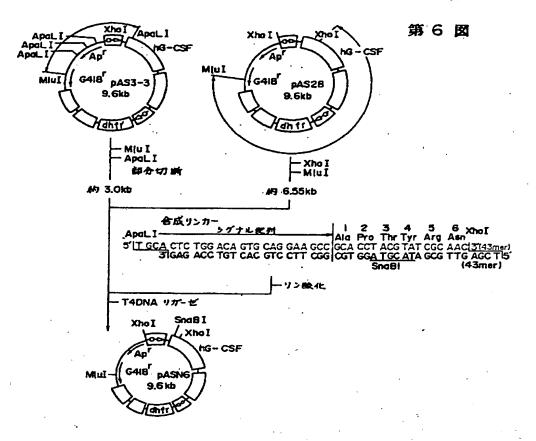
Man d1.2 Man d1.6 Man d1.6 Man d1.3 Man d1.6 Man d1.3 Man d1.4 GlcNAc — Asn Man d1.5 Man d1.6 Man d1.3 Man d1.6 Man d1.3 Man d1.3 Man d1.3 Man d1.3 Man d1.3 Man d1.3 Man d1.6 GlcNAc Man d1.3 Man d1.6 Man d1

第3図

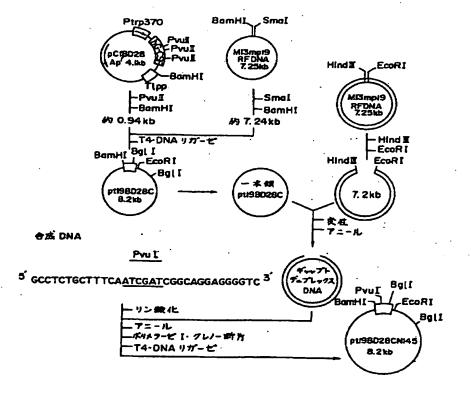


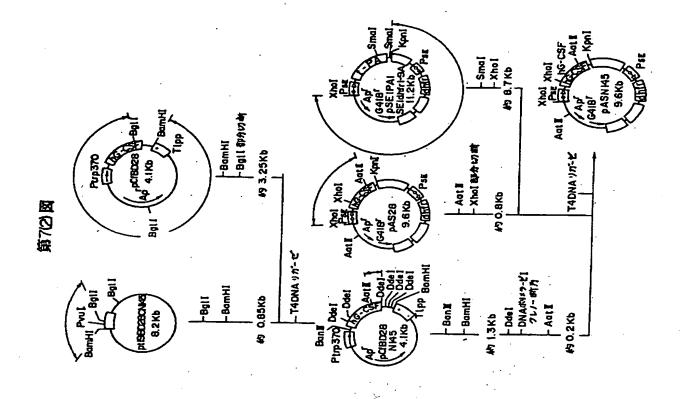






第70) 囡



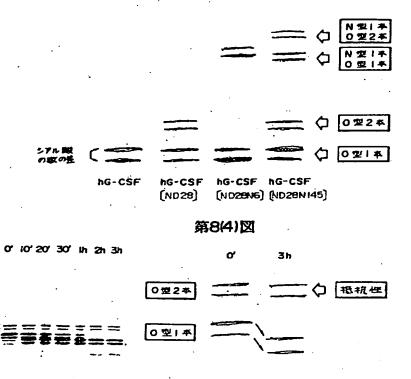


団面の浄音(内容に変更なし)

第8(2)図

大陽岳 CHO細胞		,	大陽的 CHO知肥
hG-CSF hG-CSF (ND28) hG-CSF (ND28) hG-CSF (ND28N6) hG-CSF (ND28N45) CHOx音像上対		-4-5	hG-CSF (ND28) hG-CSF (ND28) hG-CSF (ND28) l hG-CSF (ND28N45) CHO 28 LA
45 KD -	93 KD -	_	
• • • •	66 KD -	-	
= =	45 KD -	_	一黃葉豆
31 KD	31 KD _		in plant but the state of the s
22 KD -	22 KD _		
	14 KD _		:
•			

第8(3)図

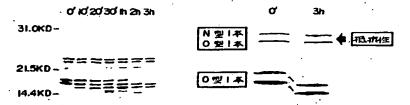


図面の浄書(内容に変更なし)

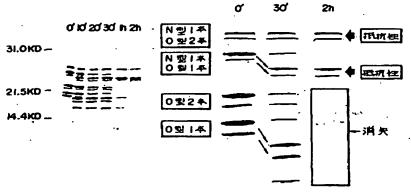
31.0KD -

14.4KD -

第8(5)図



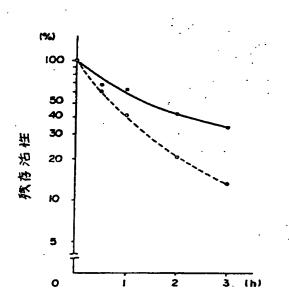
第8(6)図

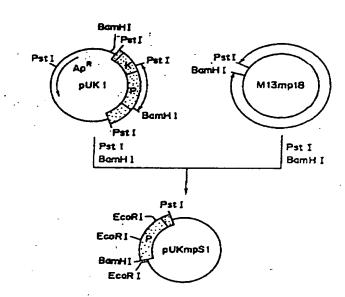


国面の浄音(内容に変更なし)

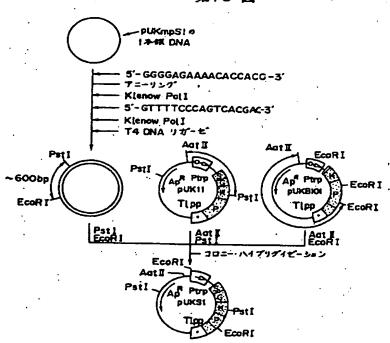
第8(7)図

第9 図



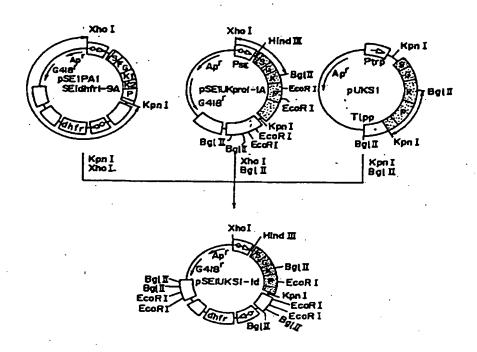


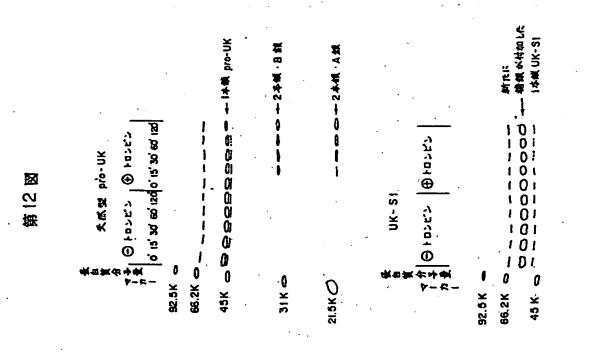
第10図



3 × 0

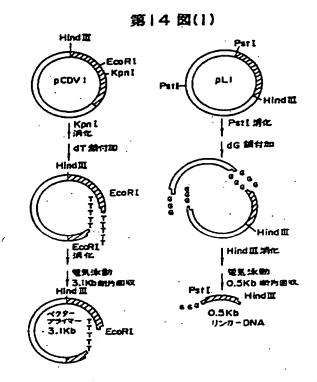
21.5K.O



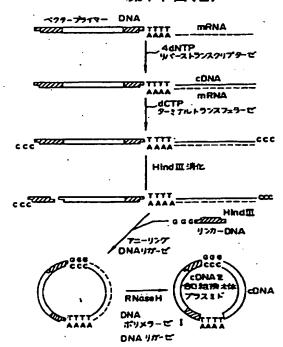


特開平 2-227075 (77)

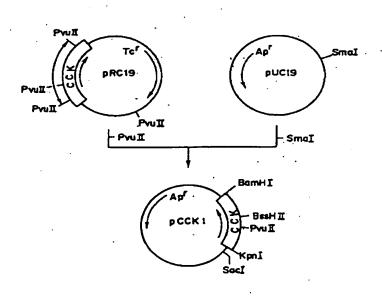
第13回 第13回 UK-SI pre-UK 反応時間 (分)



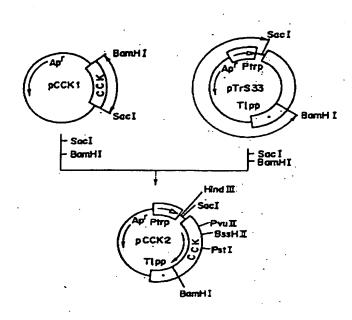
第14 図(2)

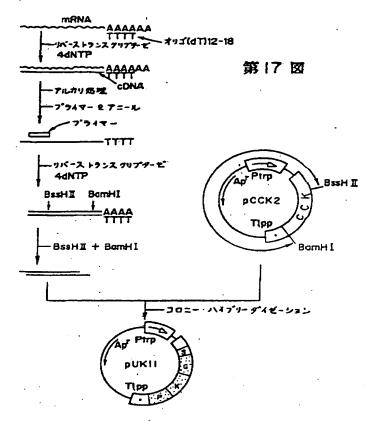


第15 図

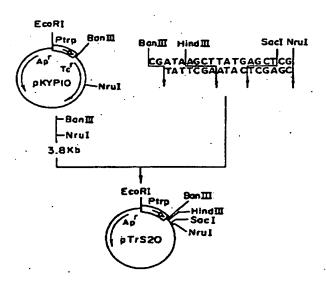


第16 図



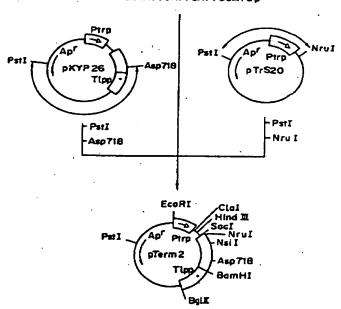


第18 図



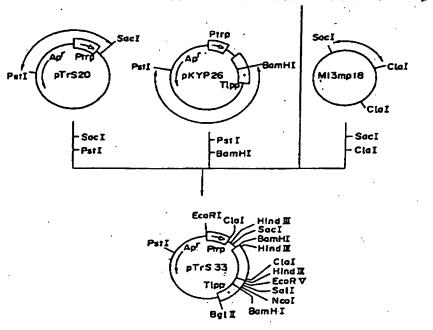
第20図

P CGATGCATAAGTAAGTAAG GCTACGTATTCATTCCATG P



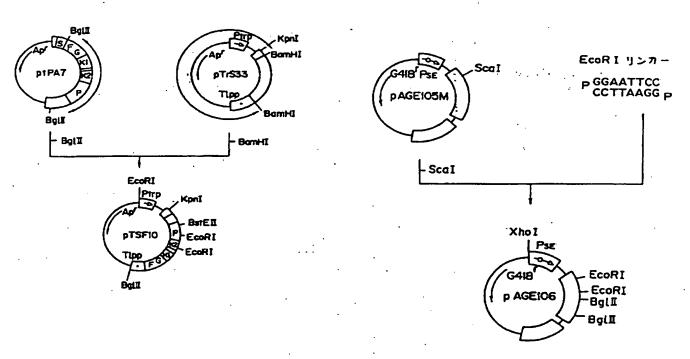
第19 図

p CGATAAGCTTATGATATCGAACGTCGACGACGGCGTCGAACCATGGCCG TATTCGAATACTATAGCTTGCAGCTGCCGCCGCCTTGGTACCGGCCTAG p

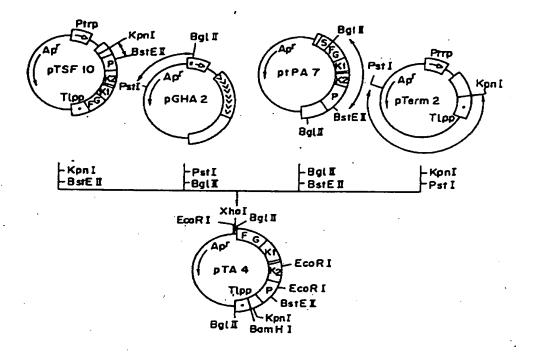


第21図

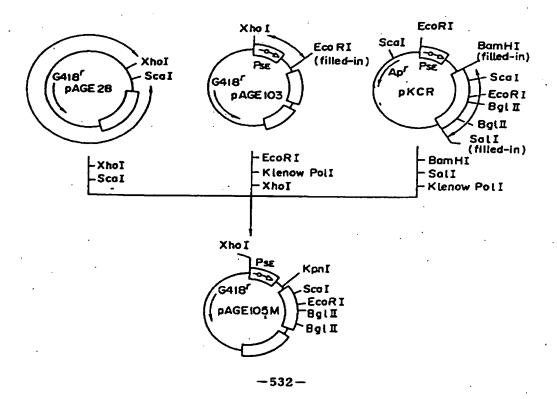
第24図



第22図

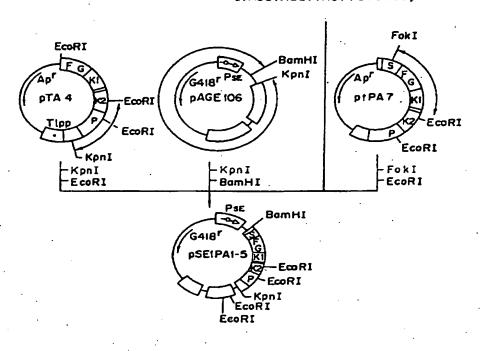


第23 図



第25図

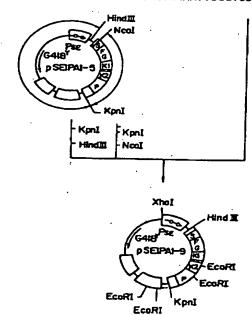
pGATCCATGGATGCAATGAAGA GTACCTACGTTACTTCTCCCp



第26図

PAGCTTGAGATCCTACAGGAGTCCAGGGTCGAGAGAGAGACACTCTCTTCTAGAGACACCCTCTTTTP

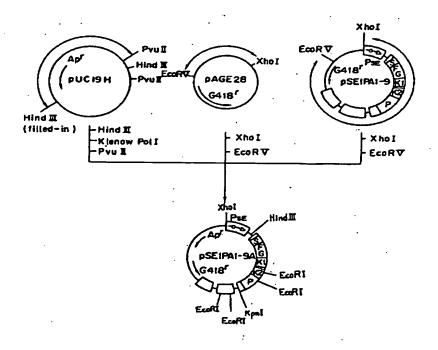
PAGGAAAGGGAAGCAAGCCGTGAATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAAT

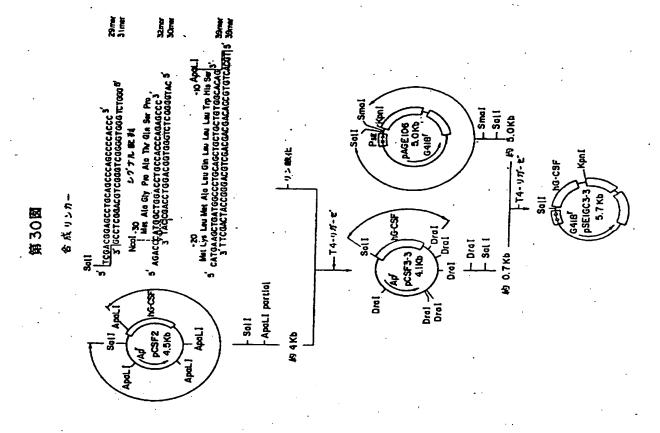


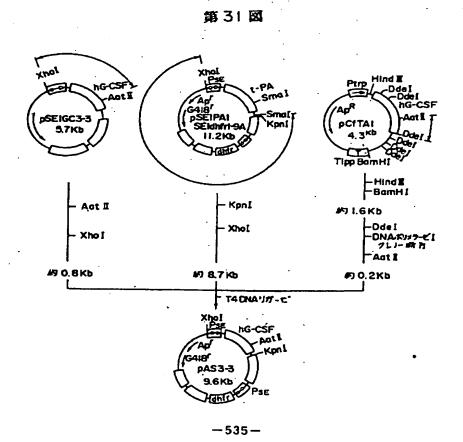
特開平2-227075 (82)

第29図 Hind I Asp718 第27 図 **SV2UM**r PAGE 106 pSEIPAH9A G418^r Sept Bel I Dral Asp718 Klenow Poli Mtul Ball Klenow Poli Hindi Hind **I** Ml⊔∫ Ap Hind pUC19 Hind皿 リンカー Xhol PEAAGCTTE Drail Oral pSEIdhfrIA Drai G418 MIUIT G418 Hind Clai Klenow Poli **I**onX Apr Hind I pUCI9H Hind **T**i (G418) HIndII pSEIPAI SEIdHri-9A EcoRI

第28図





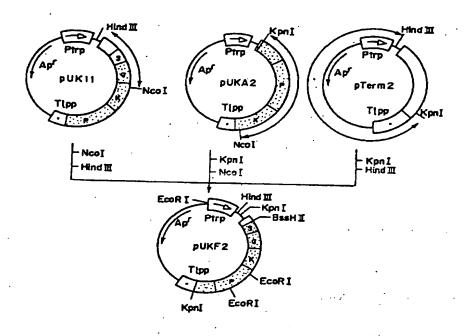


BOIL

第33 図

PGGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC AC CCC TTA CCA GTG AAA ATG GCT CCT TTC CGG TCG TGA CTG TG GTA CP Ptrp Pirp KpnI KpnI pTrS 33 pTerm 2 NcoI -SmoI -KpnI -Kpn I Pst I -Nco I PatI Nco I **PUKB 101** KpnI BamHI

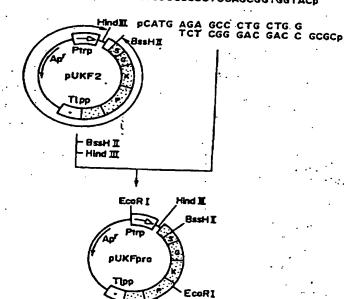
第34 図



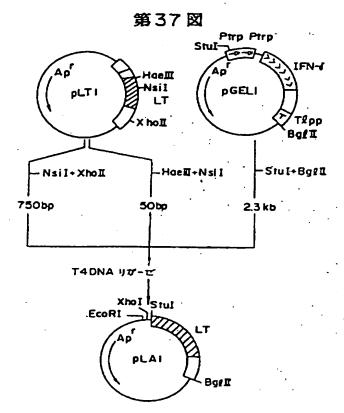
第35 図

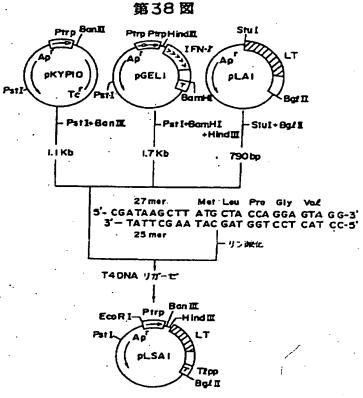
PAGCTTGTCCCGCAGCGCCGTCGCGCCGCCGCAG ACAGGGGCGTCGCGGCAGGCGCGCGTCGGTGGP

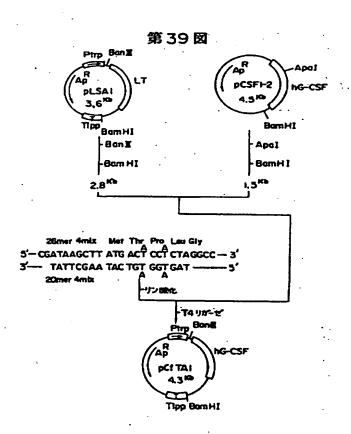
pGCCACCGAGGCCGCCGCCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCAC
CTCCGGCGGCGGCAGATCGCGGGGCTGGAGCGGTGGTACp

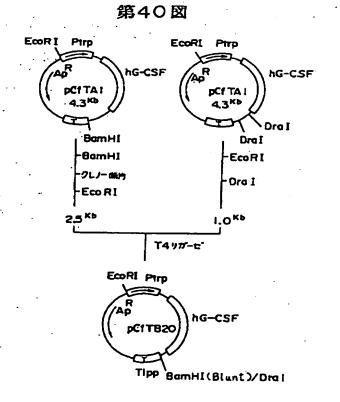


EcoRI

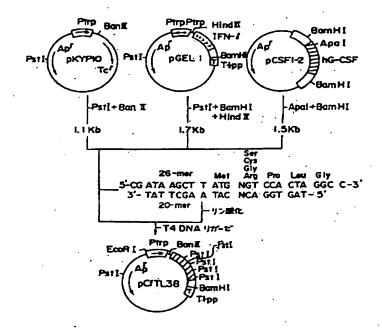




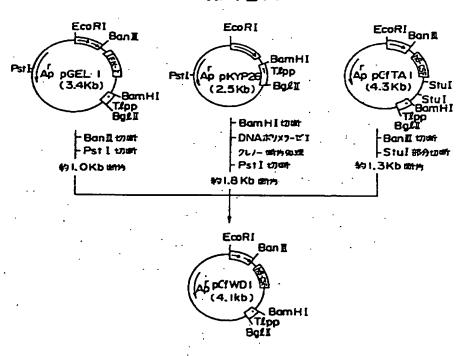


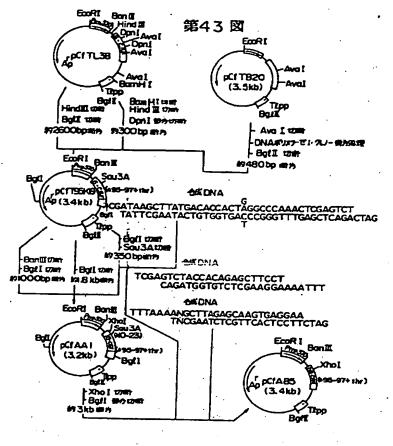


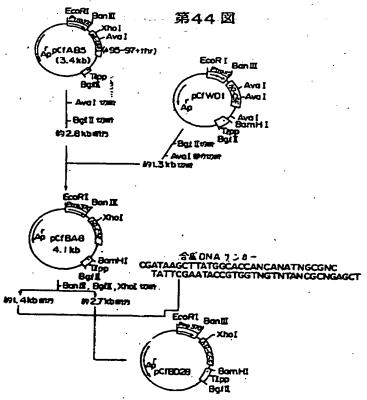
第4| 図

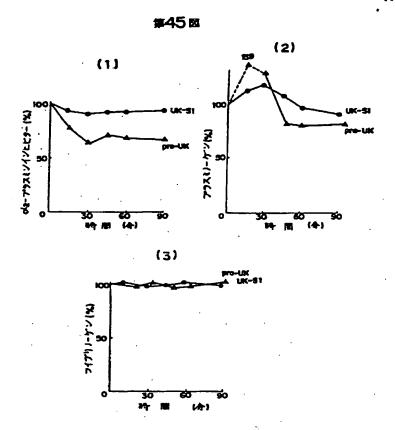


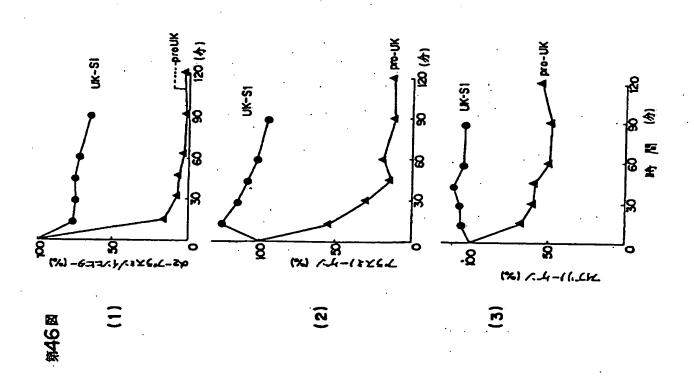
第42図







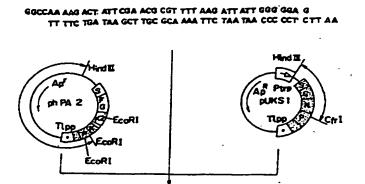




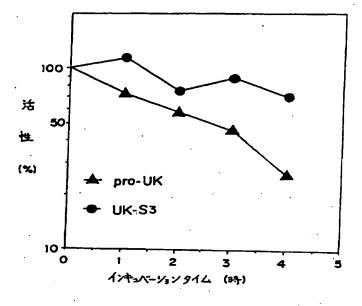
第49図

7 第47图

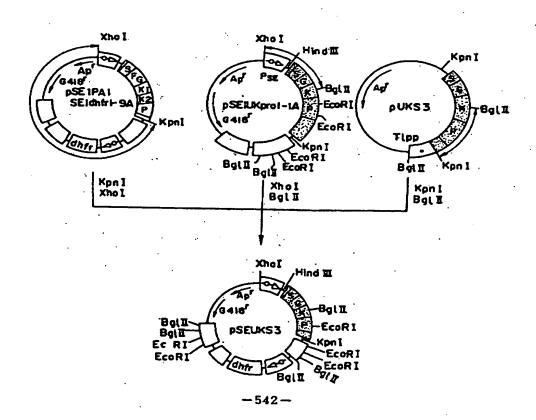
蛋白濃度10μg/mt.70℃.4h



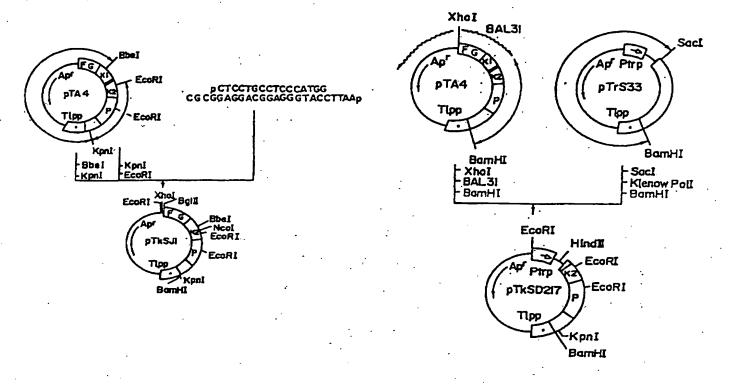
AP Pup



第48 図

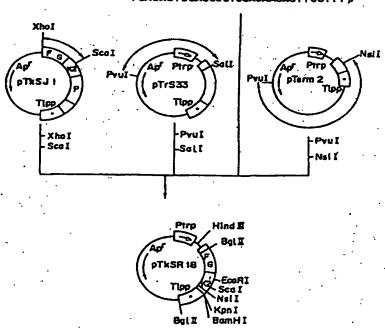


第 50 図



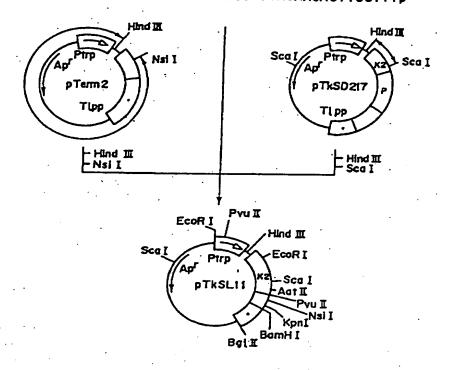
年5/図

PACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTT p



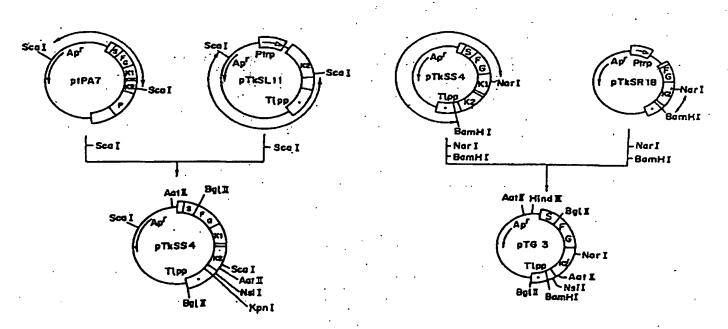
第 5 3 図

PACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTTTP

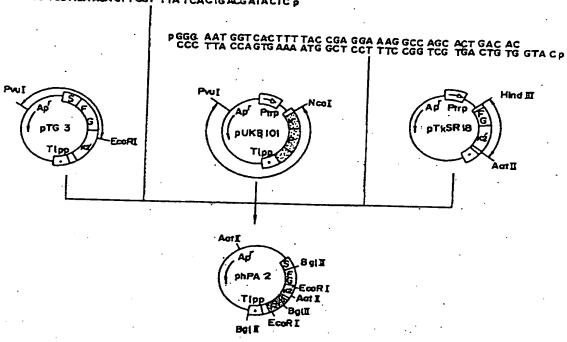


第54 四

・ 第55 図







第1頁の統合		4 - + 1	· ·
Dint. Cl. ⁵		識別記号	厅内整理番号
	1/21 5/10	·-	8515-4B
· 1	9/64 5/27 5/58 5/70 5/85	2	Z 7823-4B
//(C 12 N C 12 R C 12 P 21 C 12 P 21 C 12 P 21	1/02 1/21 1: 19) 1/02 1: 19) 1/02 1: 91)	ZNA C	8214—4B 8214—4B

手統補正 (方式)

平成 2年 1月 23日

特許庁長官殿



1. 事件の表示

平成1年特許職第253097号

2. 発明の名称

新垣ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出職人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

名 称 (102) 協和證碍工業株式会社

(TEL: 03 - 282 - 0036)

代表者 加 剪 龄 :

4、補正命令の日付

平成1年12月12日 (発送日: 岡1年12月26日)

5. 補正の対象

國軍

6. 補正の内容

顧書に最初に添付した図面の浄書・別紙のとお り (内容に変更なし)

拉本 (字)

